



UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

***ESTUDIO DE MARCADORES BIOLÓGICOS ASOCIADOS
AL DESARROLLO DE EDEMA EN LA ISQUEMIA
CEREBRAL: ESTUDIO CLÍNICO-EXPERIMENTAL***

Dirigido por

Prof. Dr. José Castillo

Dr. Tomás Sobrino Moreiras

Dr. Pedro Ramos Cabrer

***Trabajo presentado por D. Octavio Moldes Miguélez para optar
al Grado de Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela.***

Santiago de Compostela, Febrero 2011

ISBN 978-84-9887-633-8 (Edición digital PDF)

La ciencia se podría comparar con lo que siente una persona que visita por primera vez el Gran Cañón del Colorado. Va avanzando difícilmente, por lo escarpado del camino, y aunque está maravillado con lo que ve, no se detiene porque tiene la extraña certeza de que un poco más adelante encontrará algo aún más sorprendente, más espectacular, que compensará con mucho todas las dificultades que le plantee el camino

Konstantin Novoselov. Premio Nobel Física 2010

Aos meus pais.

A Álex.

AGRADECEMENTOS

Aínda que esta tese está escrita en castelán, quero explicar que esta pequena parte da tese, a dos agradecementos, está escrita en galego coma “homenaxe” aos meus pais, galegofalantes de toda a vida.

En multitude de ocasións escoitei comentar que unha tese non só é un traballo académico, senón que debido ás dificultades que tes que afrontar ao longo de varios anos, axúdache a madurar en todos os aspectos da vida. Pensaba, sinceramente, que iso era unha mera esaxeración, que un se limitaba a facer o seu traballo, entre pipetas e microscopios, e que iso non tiña por que cambiar nada na túa personalidade. Sen embargo, afortunadamente, estaba errado.

Fáiseme difícil expresar a miña gratitude hacia todos aqueles que co seu apoio, tesón, camaradería ou “chantaxe emocional” me botaron unha man ao longo destes case cinco anos. De feito, creo que esta é a septuaxésima vez que reviso este apartado da tese...

En primeiro lugar quero agradecer ao Profesor Castillo a grande oportunidade que supón traballar baixo a súa dirección, sen a cal non sería posible levar a cabo o traballo que aquí presento. Estou seguro de que todos os que formamos parte do *Laboratorio de Investigación en Neurociencias Clínicas* compartimos a idea de que grazas ao seu traballo e ilusión, sentáronse as bases para alcanzar as metas que nos propoñamos.

Grazas tamén ao meu codirector, o Dr. Tomás Sobrino, polo enorme apoio que me brindou dende o primeiro día que entrei no laboratorio. Coñecémonos dende hai doce anos e sen lugar a dúbidas, neste tempo a nosa amizade foi acrecentándose a base de compartir ledicias e tristuras, pasos obrigados da vida.

Gustaríame dar as grazas tamén ao Dr. Pedro Ramos polo seu excelente traballo na parte *in vivo* desta tese, ademáis de polas suxestións en temas metodolóxicos que xorden continuamente nun laboratorio de investigación.

A maioría dos traballos que se realizan no *LINC* son de carácter translacional, isto é, buscan a aplicación dos achados nos doentes. Por iso, tampouco podo esquecer a axuda dun gran equipo clínico formado polo Dr. Rogelio Leira, o Dr. Miguel Blanco, o Dr. Manuel Yáñez, a Dra. Susana Arias e a Dra. Xiana Rodríguez Osorio. Tamén quero agradecer aos residentes José Ferro e Manuel Pías as súas aportacións dun ou doutro xeito na realización deste traballo. Asimesmo, grazas tamén aos doentes e ás súas familias, sen as cales non se podería ter levado a cabo esta investigación.

També m'agradaria recordar l'ajuda prestada pel grup de recerca del Dr Antonio Dávalos, especialment la Dra Teresa Gassul i la Dra Jovita Ponce.

Tamén aos meus compañeiros Raquel, David, Jesús, María, Bárbara, Fran, Joserra, David Barral e aos que xa non están, grazas polos consellos sobre multitude de temas de laboratorio e polos bos momentos á hora do café. En concreto gustaríame agradecer a Raquel o seu apoio cos cultivos e a Jesús o seu enorme esforzo cos modelos animais, entre outras razóns, polas fins de semana investidas no laboratorio.

Nesta sección non podo esquecer á Dra. Manuela Alonso, polos consellos e a xenerosidade que amosou ao botarme unha man de forma desinteresada sobre calquera dúbida que me xurdise, e moi especialmente sobre a técnica de Western Blot.

Nun apartado máis persoal, gustaríame facer unha mención moi especial a quen estes dous últimos anos me prestou un apoio incondicional, dándome os seus consellos e sobre todo escoitándome: Moneyba. Isto é, en gran parte, obra túa. Moitísimas grazas, “Plastidecor”!

Grazas tamén a Belén. Grazas polos bos momentos que temos pasado, no Embora con Dani e Tamara, tomando algo por aí, ou simplemente provocando ao *persoal* en teatro. En definitiva, grazas pola túa espontaneidade, vitalidade, e ese sentido do humor “tan pouco” madrileño, que fixo que me esquecese da tese por momentos.

Grazas a Tania, Antonio, Sebas e Xiana por esas conversas tan intensas que temos de calquera tema, tanto da “orixe do pensamento filosófico

moderno” coma do malo que é o transporte público en Santiago de Compostela, e por algo moito máis importante: ser a miña familia en Santiago.

E que dicir dos meus pais? A verdade que chegados a este punto, todas as teses son iguais. Eu non vou ser menos, só podo dicir que sen eles nada disto estaría pasando cunha seguridade do cento por cento. Grazas por ensinarme o valor do esforzo, a humildade, a constancia e a honestidade cun mesmo e cos demais. Teño que confesarvos unha cousa: cada vez que tomo unha decisión, teño moi en conta todos e cada un dos vossos consellos, aínda que non o pareza.

E non me gustaría rematar sen lembrar a meu irmán Álex. En realidade non sei moi ben como escribir isto. Son tantas as cousas que che teño que agradecer, que non son quen de expoñelas, e aínda por riba o espacio dun so parágrafo tampouco axuda. Por iso simplemente quero que saibas o moito que che agradezo que estiveses aí cando peor viñeron, mesmo coas leas que temos de cando en vez. O único que che podo dicir, aínda a risco de ser moi pouco orixinal, é que ***sempre estarei en débeda contigo.***

Espero non esquecerme de ninguén, a todos:

¡MOITAS GRAZAS!

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	11
Enfermedad cerebrovascular	11
Concepto	11
Epidemiología	11
Clasificación	14
Factores de riesgo vascular	19
Factores de riesgo no modificables	19
Factores de riesgo modificables	20
Fisiopatología del ictus isquémico	22
Penumbra isquémica	24
Cascada isquémica	26
Edema cerebral	33
Fisiopatología edema cerebral	33
Diagnóstico y tratamiento del edema: limitaciones	44
Endotelina-1, antagonistas y edema cerebral	53
JUSTIFICACIÓN	61
HIPÓTESIS	65
OBJETIVOS	69
MATERIAL Y MÉTODOS	73
Efecto protector de los antagonistas de los receptores de Endotelina-1 en cocultivos de astrocitos y endoteliales de rata sometidos a privación de oxígeno y glucosa	73
Preparación de cocultivos de células endoteliales de microvasculatura y astrocitos de rata	73
Evaluación integridad del cocultivo	77
Privación de oxígeno y glucosa (POG)	79
Grupos de estudio, protocolo experimental y tratamientos	80
Efecto neuroprotector de los antagonistas de los receptores de Endotelina-1 en un modelo experimental de isquemia	90
Animales de experimentación	90
Oclusión intraluminal transitoria de la Arteria Cerebral Media	91
Grupos de estudio	95
Extracción y procesamiento de las muestras	95
Test sensoriomotor	96
Estudios de resonancia magnética	97
Medición niveles séricos de Endotelina-1, análisis de AQP4 y AQP9 en los grupos de estudio	103

Asociación de polimorfismos en el gen de la Endotelina-1 con el grado de edema en pacientes con ictus isquémico	106
Selección de pacientes de estudio	106
Evaluación clínica	107
Evaluación de neuroimagen.....	108
Evaluación pronóstica	109
Evaluación molecular	110
Definiciones.....	112
Análisis estadístico.....	113
RESULTADOS	117
Efecto protector de los antagonistas de los receptores de Endotelina-1 en cocultivos de astrocitos y endoteliales de rata sometidos a privación de oxígeno y glucosa	117
Caracterización del modelo de cocultivo de células endoteliales y astrocitos de rata.....	117
Resultados Fase I.....	119
Efecto privación de oxígeno y glucosa sobre la muerte celular	119
Perfil temporal producción Endotelina-1 endógena tras la privación de oxígeno y glucosa.....	119
Evolución TEER tras la privación de oxígeno y glucosa	120
Análisis presencia proteínas unión estrecha.....	121
Resultados Fase II.....	122
Efecto de los antagonistas de los receptores de la Endotelina-1 sobre la muerte celular.....	122
Relación TEER con los diferentes tratamientos.....	125
Producción acuaporinas.....	127
Efecto neuroprotector de los antagonistas de los receptores de Endotelina-1 en un modelo experimental de isquemia	130
Influencia de los diferentes tratamientos sobre el edema cerebral	130
Influencia de los diferentes tratamientos sobre el volumen de lesión	132
Volumen absoluto	132
Porcentaje de volumen del hemisferio ocupado por la lesión	133
Influencia de los diferentes tratamientos sobre las escalas funcionales.....	135
Niveles de Endotelina-1 con los diferentes tratamientos.....	137
Análisis de la influencia de los diferentes tratamientos sobre la producción de AQP4, AQP9 en cerebro de rata tras la inducción de isquemia.....	138

Asociación de polimorfismos en el gen de la Endotelina-1 con el grado de edema en pacientes con ictus isquémico	141
Descripción de la muestra.....	141
Frecuencias de los polimorfismos del gen de la Endotelina-1	142
Comprobación equilibrio Hardy-Weinberg.....	143
Asociación de los polimorfismos del gen de la Endotelina-1 con los niveles séricos de Endotelina-1.....	143
Asociación de los niveles séricos de Endotelina-1 con el edema cerebral	149
Asociación de los niveles séricos de Endotelina-1 con el volumen de infarto.....	154
Asociación de los niveles séricos de Endotelina-1 con el deterioro neurológico precoz	156
Asociación de los niveles séricos de Endotelina-1 con el mal pronóstico	157
Asociación de los polimorfismos del gen de la Endotelina-1 con el edema cerebral, volumen de infarto, deterioro neurológico precoz y pronóstico del infarto a los 3 meses.....	159
Edema	160
Edema grave.....	160
ASPECTS≤7	162
Volumen de infarto.....	164
Pronóstico a los 3 meses	166
DISCUSIÓN	171
Efecto protector de los antagonistas de los receptores de Endotelina-1 en cocultivos de astrocitos y células endoteliales de rata sometidas a privación de oxígeno y glucosa, y en un modelo experimental de isquemia cerebral.....	171
Modelo de cocultivo	171
Efecto de la privación de oxígeno y glucosa sobre la muerte celular.....	173
Modelo de isquemia experimental	175
Efecto protector de los antagonistas de los receptores de Endotelina-1	177
<i>In vitro</i>	177
Liberación LDH	177
Niveles de caspasa-3	180
Medidas de la TEER.....	180
<i>In vivo</i>	181
Mecanismo de protección de los antagonistas de receptores de Endotelina-1: Regulación de AQPs.....	185
Resumen.....	188

Asociación de polimorfismos en el gen de la Endotelina-1 con el grado de edema en pacientes con ictus isquémico	188
Resumen.....	195
Limitaciones del estudio	195
CONCLUSIONES	201
BIBLIOGRAFÍA	205

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y FÓRMULAS

ACCD	Arteria Carótida Común Derecha
ACE	Arteria Carótida Externa
ACI	Arteria Carótida Interna
ACM	Arteria Cerebral Media
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AIT	Ataque Isquémico Transitorio
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato
AMPc	Adenosín Monofosfato Cíclico
AQP	Acuaporina
ASPECTS	Del inglés Alberta Stroke Program Early CT Signs
ATP	Adenosín Trifosfato
BE	Exceso de Bases (del inglés Bases Excess)
BHE	Barrera Hematoencefálica
CI	Cardiopatía Isquémica
CaCl₂	Cloruro de calcio
Cl⁻	Ion cloruro
CO₂	Dióxido de carbono
CPP	Presión de Perfusión Cerebral (del inglés Cerebral Perfusion Pressure)
Cu⁺²	Ion cúprico
DAG	Diacylglicerol
DIV	Días <i>in vitro</i>
DM	Diabetes mellitus
DMEM	Del inglés Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNP	Deterioro Neurológico Precoz
EAAT	Del inglés Excitatory Aminoacid Transporter
EBM	Del inglés Endothelial Basal Medium
EDTA	Del inglés Ethylenediaminetetraacetic acid
EGM	Del inglés Endothelial Growth Medium
EGTA	Del inglés Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
ELISA	Del inglés Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
eNOS	Síntasa del Óxido Nítrico Endotelial
ET-1	Endotelina-1
ETR_A	Receptor A de la Endotelina-1
ETR_B	Receptor B de la Endotelina-1
ETR_{B1}	Receptor B1 de la Endotelina-1
ETR_{B2}	Receptor B2 de la Endotelina-1
ex/em	excitación/emisión
FA	Fibrilación Auricular

FBS	Del inglés Fetal Bovine Serum
FSC	Flujo Sanguíneo Cerebral
fmol	Femtomol (10^{-15} moles)
GFAP	Del inglés Glial Fluorescent Acidic Protein
Glu	Glucosa
Hb	Hemoglobina
HBSS	Del inglés Hank's Buffered Solution Salt
HCO₃⁻	Bicarbonato
Hct	Hematocrito
HDL	Del inglés High Density Lipoprotein
Hg	Mercurio
HTA	Hipertensión Arterial
Hz	Herzio
ICAM-1	Del inglés InterCellular Adhesion Molecule 1
IL-1	Interleuquina 1
IL-1β	Interleuquina 1 Beta
IL-2	Interleuquina 2
IL-6	Interleuquina 6
IL-10	Interleuquina 10
JAM	Del inglés Junctional Adhesion Molecule
iNOS	Forma inducible de la Sintasa de Óxido Nítrico
INR	Del inglés International Normalized Ratio
K⁺	Ion potasio
KA	Kainato
KCl	Cloruro potásico
KDa	Kilodalton
KH₂PO₄	Fosfato diácido potásico
L	Litro
LACI	Del inglés Lacunar Infarction
LDH	Lactato deshidrogenasa
M	Molar
mM	Milimolar
MAGUK	Del inglés Membrane Associated Guanylate Kinase
MCAO	Del inglés Middle Cerebral Artery Occlusion
MCP	Proteínas quimiotácticas de monocitos
Mg⁺²	Ion magnesio
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
min	Minutos
MIP-1	Del inglés Macrophage Inflammatory Protein
MMP	Del inglés Matrix Metaloprotease
mOsm/L	Miliosmolaridad

mRS	Del ingles Modified Rankin Scale
mT/m	Militeslas/metro
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol
MHz	Megahertzio
N₂	Nitrógeno
Na⁺	Ion sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
NaF	Fluoruro de Sodio
NaHCO₃	Bicarbonato sódico
Na₂HPO₄	Fosfato dibásico sódico
NaH₂PO₄	Fosfato diácido sódico
NIHSS	Del inglés National Institute for Health Stroke Scale
NMDA	N-metil-D-aspartato
nM	Nanomolar
nNOS	Sintasa del Óxido Nítrico neuronal (Del inglés neuronal Nitric Oxyde Syntase)
NO	Óxido nítrico
N₂O	Óxido nitroso
NOS	Sintasa del Óxido Nítrico (Del inglés Nitric Oxyde Syntase)
Na₂P₄O₇	Ortofosfato sódico
Na₃VO₄	Ortovanadato sódico
O₂	Oxígeno
OCSP	Del inglés Oxford Community Stroke Project
OGD	Del inglés Oxygen Glucose Deprivation
OMS	Organización Mundial de la Salud
PACI	Del inglés Partial Anterior Circulation Infarction
PAD	Presión Arterial Diastólica
PAF	Del inglés Platelet Activation Factor
PAS	Presión Arterial Sistólica
pCO₂	Presión parcial de CO ₂
PCR	Del inglés Polymerase Chain Reaction
PCR	Proteína C Reactiva
PDL	Poly-D-Lisina
PET	Del inglés Positron Emission Tomography
pH	Logaritmo a signo cambiado de la actividad de los hidrogeniones
PIC	Presión Intracraneal
PKC	Proteín KinasaC
pNA	Paranitroanilina
pO₂	Presión parcial de Oxígeno

POCI	Del inglés Posterior Circulation Infarction
POG	Privación de oxígeno y glucosa
PSG	Del inglés Penicilin, Streptomycin, Glutamine
PVDF	Del inglés Polivinilidene fluoride
RM	Resonancia Magnética
ROS	Del inglés Reactive Oxygen Species
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Del inglés Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Del inglés Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electroforesis
SEN	Sociedad Española de Neurología
SHR	Del inglés Spontaneously Hypertensive Rats
SIP_s	Del inglés Small Basic Intrinsic Proteins
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Del inglés Single Nucleotide Polymorphisms
sO₂	Oxígeno en disolución
STAIR	Del inglés Stroke Therapy Academy Industry. Roundtable
TACI	Del inglés Total Anterior Circulation Infarction
TBS	Del inglés Tris Buffer Saline
TBST	Del inglés Tris Buffer Saline Tween 20
TC	Tomografía Computerizada
tCO₂	CO ₂ total
TEER	Del inglés Transendothelial Resistivity
TH	Transformación Hemorrágica
TNF-α	Del inglés Tumour Necrosis Factor
TOAST	Del inglés Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment
tPA	Del inglés tissue Plasminogen Activator
U/mL	Unidades/mililitro
V	Voltio
VEGF	Del inglés Vascular Endothelial Growth Factor
W	Watio
WCP	Del inglés Water Channel Proteins
ZO	Zonula Occludens
µg/mL	Microgramo/mililitro
µL	Microlitro
µm	Micra (micrometro)
µM	Micromolar
µmol	Micromol
µL	Microlitro

1. INTRODUCCIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

3. HIPÓTESIS

4. OBJETIVOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

6. RESULTADOS

7. DISCUSIÓN

8. CONCLUSIONES

9. BIBLIOGRAFÍA

1.1. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

1.1.1. Concepto

En el término de enfermedad cerebrovascular podemos englobar todos aquellos trastornos que se caracterizan por un conjunto de manifestaciones funcionales y/o estructurales, sintomáticas o asintomáticas del sistema nervioso central derivadas de alteraciones en la circulación a nivel cerebral. Destaca dentro de este grupo de enfermedades el ictus, producido como consecuencia de una disminución del flujo sanguíneo cerebral normal, hasta llegar a unos niveles tales que pueden llegar a producir alteraciones metabólicas y bioquímicas en el SNC como la necrosis celular y que alteran el funcionamiento normal del SNC. La Organización Mundial de la Salud define el ictus como el desarrollo clínico rápido de signos focales de alteración de la función cerebral sin otra causa aparente que no sea el origen vascular¹.

1.1.2. Epidemiología

El ictus es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. Según la OMS representa la tercera causa de muerte y la primera de invalidez en la población adulta en el mundo (*Figura 1*).

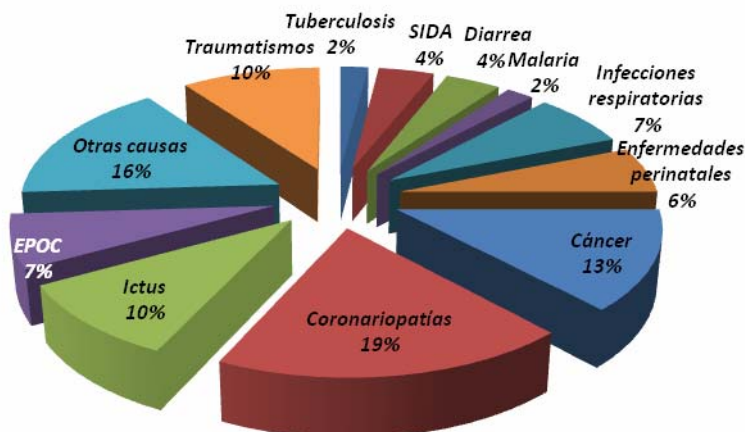


Figura 1. Causas de muerte en el mundo según la OMS (2008).

En España, según datos extraídos del organismo europeo Eurostat, en el periodo comprendido entre 2006 y 2008, y en Galicia según los datos del Plan de Saúde 2005-2009, el ictus isquémico es la primera causa de muerte en mujeres y la segunda en varones, suponiendo el 10% de la mortalidad global^{2,3}. Mientras la mayoría de los países desarrollados muestran tasas estables de mortalidad por ictus, los países en desarrollo incrementan sus tasas anuales de prevalencia y mortalidad: 4,5 de los 10 millones de fallecimientos anuales por ictus pertenecen a los países no industrializados. En España, su incidencia es de 174 casos nuevos por 100.000 habitantes/año⁴, y su tasa de mortalidad de 97,7 por cada 100.000 habitantes/año; siendo ligeramente superior en mujeres (111,9 por 100.000 habitantes/año) que en hombres (82,9 por 100.000 habitantes/año)⁵ (Figura 2).

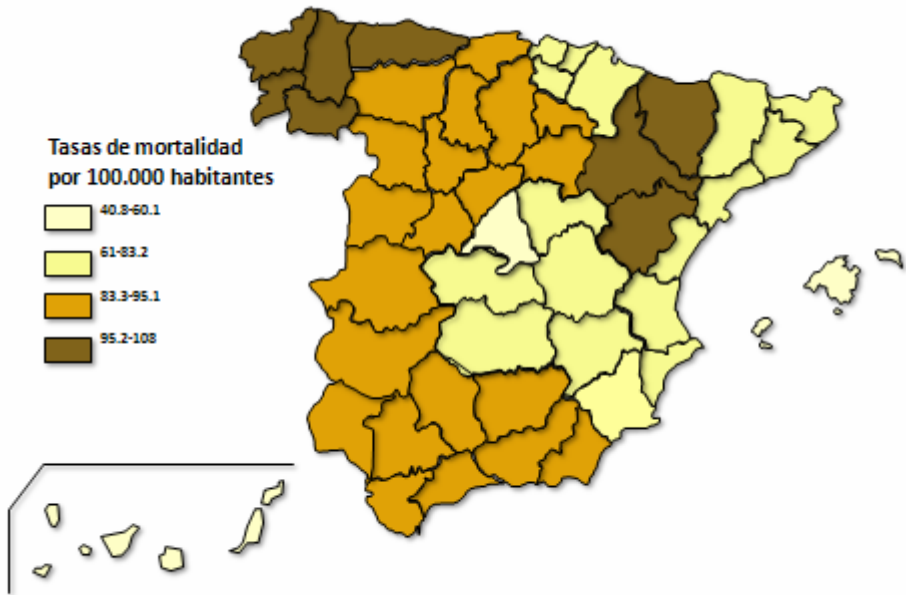


Figura 2. Mortalidad por ictus por comunidades autónomas en el periodo 2006-2008 según Eurostat.

El ictus es la principal causa de discapacidad en el adulto. Entre los supervivientes de un episodio cerebrovascular hasta un 25% desarrollará un deterioro cognitivo, en mayor o menor grado, necesitando además ayuda para la realización de sus actividades de forma normal.

Este hecho, junto con la realidad de que la incidencia del ictus aumenta en personas mayores de 65 años y que, gracias a la mejora de la calidad de vida, se está produciendo un incremento notable en la esperanza de vida y un envejecimiento progresivo de la población mundial, hace que la prevalencia de la enfermedad aumente y que en consecuencia, también lo haga la magnitud del problema sociosanitario que supone.

1.1.3. Clasificación

En cuanto a la clasificación del ictus, podemos hablar de 2 grandes categorías:

A) Isquémico

Producido por un flujo sanguíneo inadecuado, tanto cualitativo como cuantitativo que provoca un área circunscrita de infarto cerebral. Dependiendo del territorio afectado hablamos de isquemia cerebral focal cuando existe un área de disminución del flujo limitada a una zona del encéfalo, y de isquemia cerebral global cuando se afecta la totalidad del tejido, como ocurre en el caso del paro cardíaco o shock prolongado.

Los ictus isquémicos se dividen a su vez en ***ataques isquémicos transitorios*** e ***infartos cerebrales***.

Los ***ataques isquémicos transitorios*** (AIT) se definen como la disfunción cerebral focal o monocular, con una duración de los síntomas inferior a 24 horas, causada por la alteración cualitativa o cuantitativa vascular debida a trombosis o embolia arterial en relación con enfermedad arterial, cardíaca o hematológica⁶.

Por otro lado el ***infarto cerebral*** está ocasionado por la alteración cualitativa o cuantitativa del aporte circulatorio a un territorio encefálico, que determina un déficit neurológico de más de 24 horas de duración, lo cual es expresión de una necrosis tisular.

Atendiendo al mecanismo de producción, el infarto cerebral se subdivide, según los criterios TOAST^{7,8} (***Figura 3***), en:

- **Infarto aterotrombótico.** Presencia de estenosis igual o mayor al 50% del diámetro luminal u oclusión de una arteria

extracraneal o intracraneal de gran calibre que supla la región clínicamente afectada, en ausencia de otra etiología.

- **Infarto cardioembólico.** Presencia de fuente embolígena inequívoca en ausencia de otra etiología.
- **Infarto lacunar.** Infarto de menos de 15 mm de diámetro en el territorio de una arteria perforante cerebral, que suele ocasionar clínicamente un síndrome lacunar (síndrome motor, sensitivo, sensitivo-motor, hemiparesia, ataxia, disartria-mano torpe), en ausencia de otra etiología.
- **Infarto de origen inhabitual.** Infarto de pequeño, mediano o gran tamaño, de localización cortical o subcortical, en territorio carotídeo o vertebro basilar, habiendo descartado origen aterotrombótico, cardioembólico o lacunar. Suele estar producido por enfermedades sistemáticas o por otras enfermedades como disección arterial, displasia fibromuscular, aneurisma sacular, malformaciones arteriovenosas, trombosis venosa cerebral, vasculitis, migraña.
- **Infarto de origen indeterminado.** Infarto cerebral en el que tras una exhaustivo estudio diagnóstico, han sido descartados los subtipos aterotrombótico, cardioembólico, lacunar o inhabitual, o bien coexista más de una posible etiología. En este caso se pueden subdividir en indeterminado por estudio incompleto, por más de una etiología o por causa desconocida.

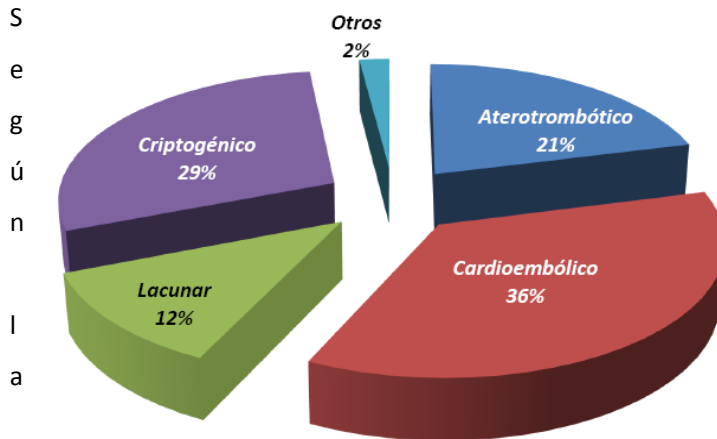


Figura 3. Clasificación TOAST de los ictus isquémicos.

OCSF⁶, los infartos cerebrales se pueden clasificar en (Figura 4):

- **Infarto total de la circulación anterior o TACI** (Total Anterior Circulation Infarction). Cuando se cumplen los tres criterios siguientes:
 1. Disfunción cerebral superior.
 2. Déficit motor y/o sensitivo en al menos 2 extremidades.
 3. Hemiapnosia anónima.
- **Infarto parcial de la circulación anterior o PACI** (Partial Anterior Circulation Infarction). Cuando se cumple alguno de los siguientes criterios:
 1. Disfunción cerebral superior (afasia, discalculia o alteraciones visoespaciales); o
 2. Cuando se cumplen 2 de los 3 criterios de TACI; o

-
3. Déficit motor y/o sensitivo más restringido que el clasificado como LACI (déficit limitado a una sola extremidad, o a cara y mano pero sin afectación del resto del brazo).
- **Infartos lacunares o LACI** (Lacunar Infarction). Cuando no existe disfunción cerebral superior ni hemianopsia y se cumple uno de los siguientes criterios:
 1. Hemisíndrome motor puro que afecte al menos a dos extremidades (valorando cara, brazo y pierna).
 2. Hemisíndrome sensitivo puro que afecte al menos a dos extremidades (valorando cara, brazo y pierna).
 3. Hemisíndrome sensitivo-motor que afecte al menos a dos extremidades (valorando cara, brazo y pierna).
 4. Hemiparesia-ataxia ipsilateral.
 5. Disartria-mano torpe u otro síndrome lacunar.
 - **Infartos de la circulación posterior o POCI** (Posterior Circulation Infarction). Cuando se cumple alguno de los criterios siguientes:
 1. Afectación ipsilateral de pares craneales con déficit motor y/o sensitivo contralateral.
 2. Déficit motor y/o sensitivo bilateral.
 3. Patología oculomotora.
 4. Disfunción cerebelosa sin déficit de vías largas ipsilaterales.
 5. Hemianopsia homónima aislada
-

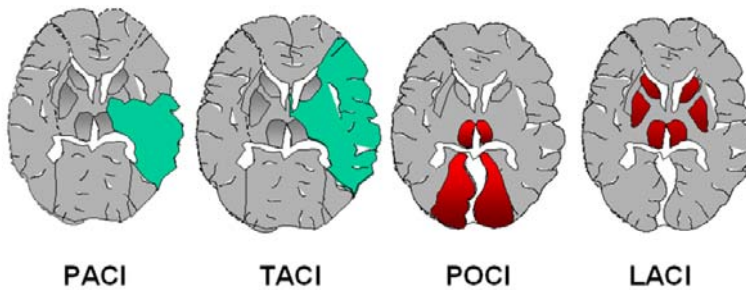


Figura 4. Clasificación OCSF: tipos de infartos cerebrales según su localización clínica.

B) Hemorrágico

En el que una extravasación sanguínea en el parénquima cerebral o en el espacio subaracnoideo produce lesión o desplazamiento de las estructuras cerebrales.

Constituyen el 20% de las enfermedades cerebrovasculares. Estos ictus hemorrágicos se pueden dividir a su vez en hemorragia intracerebral o hemorragia subaracnoidea⁶.

Dentro de las hemorragias intracerebrales se pueden distinguir la hemorragia intraventricular primaria y la hemorragia parenquimatosa, a su vez subdividida en lobar, profunda, troncoencefálica o cerebelosa.

La causa más frecuente es la hipertensión arterial (HTA). Para el resto de las causas, exceptuando la angiopatía amiloide (propia de ancianos y probablemente la más frecuente después de la HTA), la lista de etiologías en la infancia y adultos jóvenes es similar a la de las personas mayores.

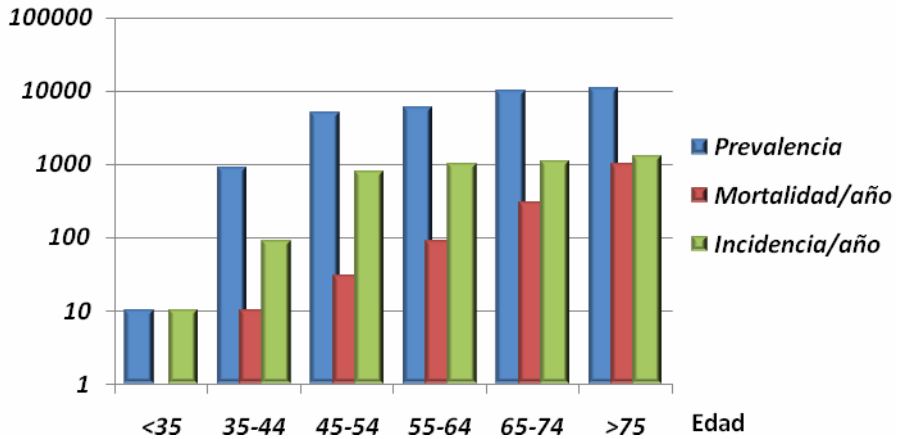
1.1.4. Factores de riesgo vascular

Una parte muy importante en la prevención de la enfermedad cerebrovascular viene derivada del conocimiento de los factores de riesgo que contribuyen a su aparición. Podemos hablar de factores de riesgo no modificables y factores modificables, y por tanto prevenibles⁹.

A) Factores de riesgo no modificables

- **Edad.** El envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo para la enfermedad cerebrovascular. La incidencia del ictus aumenta exponencialmente con la edad, alcanzando sus valores máximos por encima de los 65 años (*Gráfica 1*).

Tasa (por 100.000 habitantes)



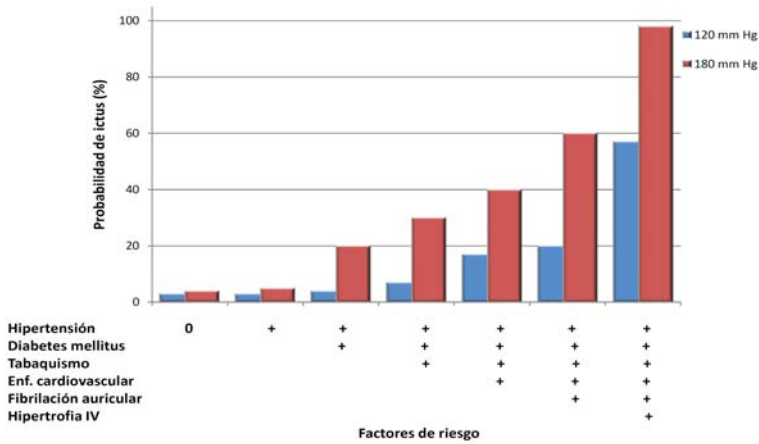
Gráfica 1. Prevalencia, incidencia y mortalidad por ictus en relación con la edad.

- **Sexo.** Se presenta mayor incidencia en los varones que en las mujeres.
- **Grupo racial.** La ateromatosis de grandes vasos afecta con mayor frecuencia a los individuos caucásicos; mientras que la patología de pequeño vaso es más frecuente en africanos y asiáticos.
- **Herencia y genética.** Existe una predisposición familiar a padecer ictus. Es posible que se deba a la asociación de factores de riesgo fundamentales, como la hipertensión arterial, la diabetes mellitus y la hipercolesterolemia. En ocasiones, en pacientes jóvenes, el único antecedente es un familiar de primer grado afecto de ictus.

B) Factores de riesgo modificables

- **Hipertensión arterial.** Es el principal factor de riesgo para cualquier tipo de ictus, tanto isquémico como hemorrágico. Todos los tipos de hipertensión, tanto sistólica como diastólica o combinada, incrementan el riesgo de ictus a partir de valores moderados. Valores de tensión arterial sistólica en torno a 140-160mmHg o diastólica de 90-94mmHg incrementan el riesgo de ictus 1,5 veces.
- **Cardiopatía.** Las enfermedades cardíacas tienen una clara asociación con los ictus, especialmente la fibrilación auricular, las valvulopatías, el infarto de miocardio, la hipertrofia ventricular izquierda y la cardiomegalia.
- **Diabetes mellitus.** Se estima que el riesgo de ictus en pacientes diabéticos aumenta en 1.8 veces en varones y 2.2 veces en mujeres. La diabetes predispone al ictus isquémico debido a su influencia en el desarrollo de aterosclerosis.
- **Hiperlipemia.** La hiperlipemia favorece el desarrollo de la ateromatosis y de la isquemia, tanto coronaria como carotídea.
- **Tabaquismo.** El consumo de cigarrillos predispone a la aparición de aterosclerosis en hombres y mujeres, con un incremento del riesgo de 2-3 veces. El tabaco facilita el espasmo arterial y el daño endotelial. Este riesgo añadido del tabaco desaparece tras cinco años de abstinencia.
- **Otros factores.** El sedentarismo, la obesidad, el ronquido nocturno, el síndrome de apneas del sueño, los anticonceptivos orales y el consumo excesivo de alcohol también se han relacionado con un incremento del riesgo de ictus.

Podemos destacar la propia asociación de diferentes factores de riesgo. Esta circunstancia presenta un efecto acumulativo que se correlaciona con un aumento exponencial del riesgo de padecer ictus (**Gráfica 2**).



Gráfica 2. Probabilidad de desarrollar un ictus a los 10 años, en dos niveles de presión arterial. Impacto de otros factores de riesgo en varones de 70 años.

En la Gráfica 2 se resumen los resultados de un estudio en el que se valora la probabilidad de desarrollar un ictus a los 10 años, en relación con la asociación de diferentes factores de riesgo en hombres de 70 años^{10,11}. Los datos se muestran en relación a dos niveles de presión arterial, 120 y 180mmHg.

1.1.5. Fisiopatología del ictus isquémico

Por su falta de sistemas de almacenamiento de sustratos energéticos, el cerebro humano depende absolutamente del aporte continuado de sangre. El cerebro se protege de la isquemia usando diversas estructuras

anatómicas cuya función principal es el mantenimiento del flujo sanguíneo en territorios isquémicos a partir de la irrigación de territorios normalmente perfundidos. Únicamente cuando se saturan estos sistemas de seguridad empieza a desarrollarse el daño cerebral isquémico.

Las seis arterias principales que irrigan el cerebro (arteria cerebral anterior, media y posterior, todas bilaterales) están interconectadas mediante dos sistemas principales: el polígono de Willis (**Figura 5**) y las anastomosis leptomeníngicas de Heubner. El polígono de Willis se localiza en la base del cerebro y en él se establecen conexiones de baja resistencia entre los orígenes de las citadas arterias. Por su parte, las anastomosis leptomeníngicas de Heubner interconectan las ramas corticales distales.

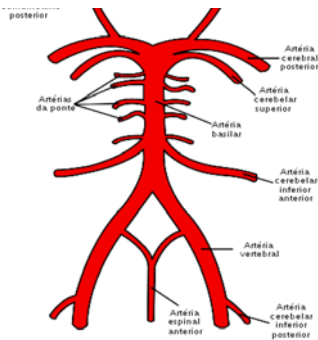
Cuando el aporte sanguíneo colateral no es suficiente para mantener una presión de perfusión normal en el territorio de la arteria obstruida, la reducción inicial del aporte sanguíneo puede compensarse durante algún tiempo por el mecanismo fisiológico de regulación de flujo: la dilatación de los vasos de resistencia. Posteriormente, la estimulación inicial del metabolismo anaeróbico causa lactoacidosis y como consecuencia un aumento adicional de la vasodilatación.

Una vez los vasos de resistencia son incapaces de regular el flujo sanguíneo, el flujo sigue pasivamente las fluctuaciones de la presión arterial sistémica.

Uno de los factores que más repercute sobre el transporte de oxígeno al tejido cerebral es el tiempo de tránsito microvascular, el cual depende de la longitud del vaso y de la velocidad del flujo. Un tiempo de tránsito mayor permite una desoxigenación más completa de la sangre, mientras que un tiempo de tránsito más corto incrementa el gradiente de difusión de oxígeno desde la sangre hasta el tejido. En el cerebro, lo intrincado



Figura 5. Esquema del polígono de Willis.



del patrón capilar y la alta velocidad de los eritrocitos tienden a contrarrestar los efectos de cada uno de ellos sobre el tiempo de tránsito.

Por otra parte, las neuronas, las células de la glía y los microvasos se organizan en el cerebro formando lo que se denomina unidad neurovascular, mediante la cual se regula el FSC¹².

Penumbra isquémica

Cuando se origina la isquemia cerebral, como consecuencia de la disminución del flujo sanguíneo hasta un nivel suficiente capaz de interferir con la función del sistema nervioso, se pueden producir una serie de alteraciones metabólicas y bioquímicas en las neuronas y en la glía, que conducirán a la necrosis celular¹³.

Cuando se obstruye un vaso sanguíneo cerebral se produce un gradiente de perfusión sanguínea. La disminución del flujo sanguíneo cerebral (FSC) en una determinada zona de tejido cerebral por debajo de 10mL/100g/min produce una rápida muerte neuronal¹⁴. Sin embargo, entre este núcleo intensamente isquémico y el parénquima normalmente perfundido (FSC>50mL/100g/min), existe una zona moderadamente hipoperfundida, cuya extensión depende del mejor o peor funcionamiento de la circulación colateral^{15,16}. Estudios recientes de tomografía por emisión de positrones (PET) han logrado diferenciar en la zona hipoperfundida dos regiones con pronóstico claramente diferenciado: una ligeramente hipoperfundida (FSC>22mL/100g/min) en la que la transformación en infarto sólo sucede en circunstancias especialmente adversas (zona oligohémica), y otra denominada de penumbra isquémica^{17,18}, con una perfusión cerebral críticamente disminuida (FSC<22mL/100g/min), pero en la que el consumo de oxígeno es todavía suficiente para preservar la supervivencia tisular (perfusión de miseria) (**Figura 6**).

Sin embargo, la penumbra isquémica no tiene que estar necesariamente alrededor de una zona de necrosis neuronal, sino que puede constituir por sí misma un territorio cerebral con aporte sanguíneo comprometido pero con un metabolismo energético preservado¹⁹.

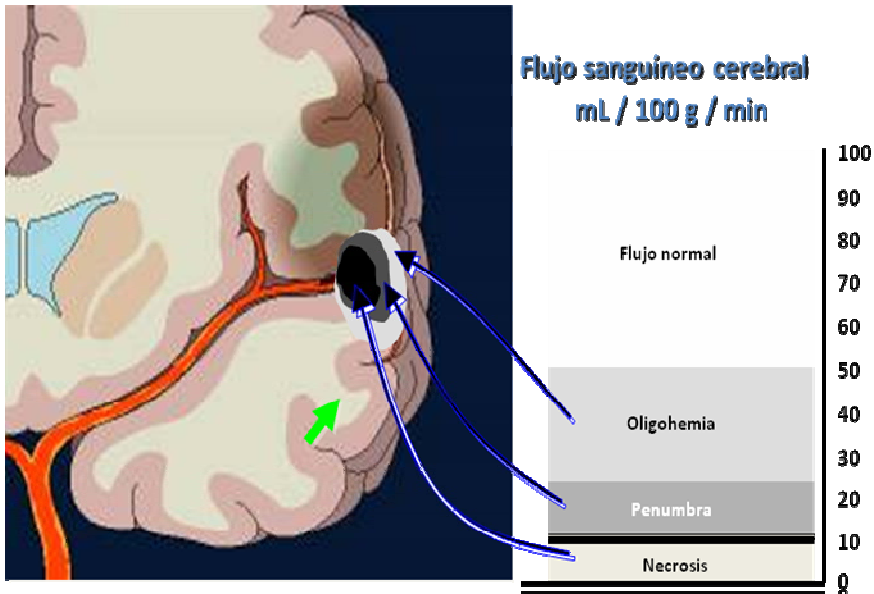


Figura 6. Zonas de tejido cerebral en relación al flujo sanguíneo tras la obstrucción de un vaso.

La penumbra isquémica se define como el tejido cerebral en el cual el flujo sanguíneo cerebral ha disminuido hasta el punto de causar silencio electrofisiológico y pérdidas pasajeras pero recurrentes de los gradientes de membrana y metabolitos energéticos²⁰. En la penumbra isquémica hay alteración de la actividad funcional de las neuronas, pero se conserva una actividad metabólica mínima que preserva la integridad estructural durante algún tiempo. En esta zona el tejido resulta dañado, se altera el mecanismo de autorregulación, se mantiene parcialmente la reactividad al CO_2 , la transmisión sináptica y el contenido de ATP son normales y disminuye el contenido de glucosa. Esto produce la aparición de síntomas neurológicos, pero no de daños irreversibles¹³. Lo importante, y que constituye la base para el tratamiento de la isquemia cerebral, es que las neuronas de la penumbra isquémica sobreviven, y

podrán recuperarse cuando se mejoren las condiciones hemodinámicas y se restaure el flujo sanguíneo cerebral que aporte de nuevo la glucosa y el oxígeno necesarios²¹.

La mayoría de los infartos cerebrales se produce en la sustancia gris, pero hasta un 20% de los casos se produce en la sustancia blanca como consecuencia de la oclusión de una arteria perforante²². La fisiopatología de la isquemia cerebral es diferente en la sustancia gris y en la sustancia blanca del cerebro, debido a que ésta no contiene cuerpos neuronales, ni sinapsis, pero sí axones mielinizados con una compleja estructura especializada²³.

La cascada isquémica

Con respecto a la sustancia gris, cuando se instaura la isquemia, de manera inmediata, el contenido energético de las células, el ATP y la fosfocreatina descienden y, en consecuencia, cesan también todas las reacciones y los mecanismos dependientes de ATP, entre los que se encuentran las bombas intercambiadoras de iones. Con el descenso del ATP, se produce un fallo en las bombas de Na^+ y K^+ , con lo que se origina una rápida depleción del K^+ intracelular, con la consiguiente despolarización neuronal.

Este hecho es responsable de la apertura de los canales de Ca^{+2} voltaje-dependientes y el desbloqueo de algunos canales de Ca^{+2} receptor-dependientes, produciendo un incremento de la concentración de Ca^{+2} intracelular de aproximadamente el doble de su valor, que aunque no es capaz de producir la muerte neuronal por sí sola, lo es de originar una despolarización de la membrana^{14,15,24,25}.

Otros flujos relevantes son la entrada de Na^+ y agua, y el posterior desarrollo de edema celular. A estos fenómenos de permeabilidad alterada de la membrana celular, y como consecuencia de los mismos, le sigue la liberación masiva de neurotransmisores al espacio extracelular; de todos los neurotransmisores liberados, el glutamato es el más relevante. Posteriormente se demostró que los efectos tóxicos del glutamato están mediados por la sobrecarga de Ca^{+2} en el interior celular. La liberación de otros neurotransmisores, noradrenalina y adenosina, activa la adenilato ciclasa unida a la membrana y hace que los niveles de AMPc y la permeabilidad de la membrana de las células gliales aumenten.

Estas células captan Na^+ , Cl^- y agua, y de esta forma contribuyen aún más al edema astrocítico perivascular y perineuronal²⁶.

Los efectos celulares del glutamato están mediados por receptores específicos (*Figura 7*). Atendiendo a criterios farmacológicos, se clasifican por su afinidad hacia tres agonistas

selectivos: N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA) y kainato (KA). La liberación masiva de

glutamato durante la isquemia determina, por consiguiente, la entrada masiva de Ca^{+2} hacia el interior de la célula²⁷.

Esto produce una cascada citotóxica en la que intervienen diferentes sustancias, desencadenando una respuesta inflamatoria.

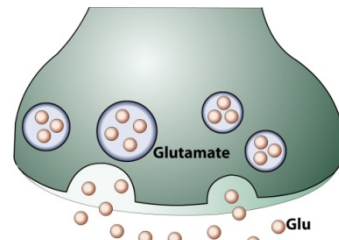
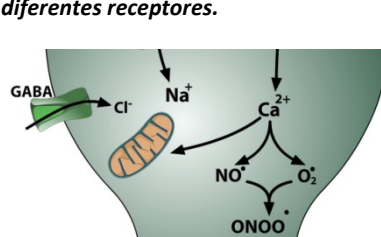


Figura 7. Acción del glutamato sobre diferentes receptores.



Por otra parte, también resulta vital la retirada del glutamato del espacio sináptico. Durante la neurotransmisión normal, las moléculas de glutamato que no se han unido a sus receptores son retiradas de la hendidura sináptica por transportadores específicos de glutamato (EAAT).

Estos procesos de recaptación están acoplados a un transporte iónico activo, por lo que en situaciones de isquemia su función se ve comprometida, aumentando la concentración extracelular de glutamato, que estimula receptores de membrana ionotrópicos (fundamentalmente AMPA y NMDA) y receptores metabotrópicos, aumentando de esta manera la concentración intracelular de Ca^{+2} .

Otro mecanismo que contribuye al incremento de la concentración intracelular de Ca^{+2} , es la acidosis inducida por la isquemia. Ante la imposibilidad de metabolizar la glucosa por vía aeróbica normal, se activa su degradación por vía anaeróbica. Como resultado se genera ácido láctico que se acumula y hace bajar el pH hasta valores de 6,5. Esta acidosis desplaza al Ca^{+2} de su unión a proteínas intracelulares y hace aumentar su concentración intracelular. Por último, en diversos estudios se ha formulado la hipótesis de que la disfunción del retículo endoplasmático durante la isquemia pueda contribuir al aumento de la concentración de Ca^{+2} intracelular.

La despolarización provoca anoxia, se inhibe la $\text{Mg}^{+2}/\text{Ca}^{+2}$ ATPasa del retículo endoplasmático, lo cual determina el flujo de Ca^{+2} desde el retículo endoplasmático hasta el citosol, con el consiguiente aumento en la concentración intracelular de Ca^{+2} ²⁸.

El incremento de Ca^{+2} en el interior de la célula ocupa un lugar central en la cascada isquémica (**Figura 8**), ya que actúa como cofactor de

numerosas enzimas implicadas en procesos que afectan en mayor o menor medida a la supervivencia celular, como las metaloproteasas de matriz, encargadas de la remodelación de la matriz extracelular²⁹.

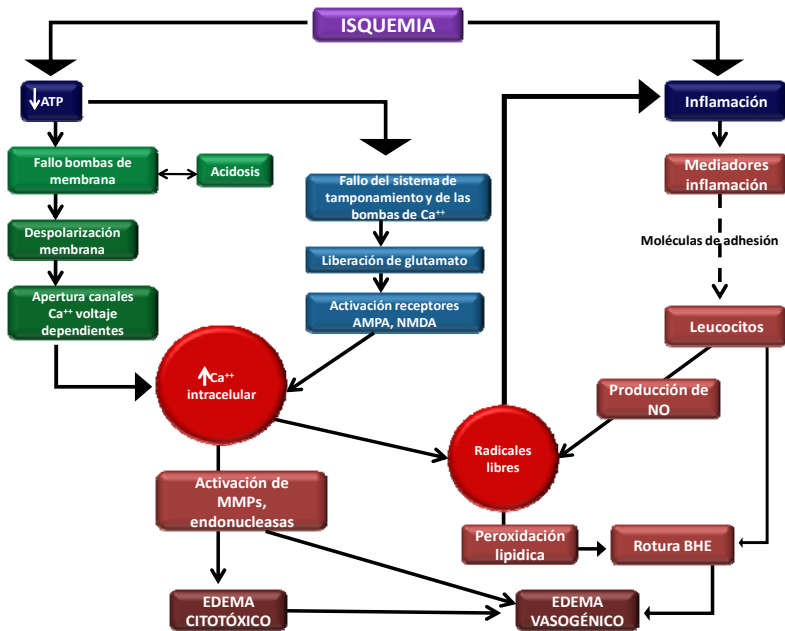


Figura 8. Esquema de la cascada isquémica.

Los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (ROS) están implicados en el funcionamiento normal de las células. En condiciones fisiológicas, los radicales libres y los ROS son eliminados tanto por mecanismos enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) como por mecanismos no enzimáticos (vitamina E y C y glutatión). Sin embargo, la exposición de las células a concentraciones anormalmente elevadas de radicales libres y de ROS resulta nociva; es lo que se conoce como estrés oxidativo.

Al estrés oxidativo, contribuye igualmente el óxido nítrico (NO), mensajero multifuncional que tiene un importante papel en la modulación de diferentes funciones del sistema nervioso central (SNC). Se sintetiza en muchos tipos celulares a partir de la L-arginina por una familia de tres isoenzimas denominadas NO sintasas (NOS): neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e inducible (iNOS). Las isoformas neuronal y endotelial se expresan de forma constitutiva en neuronas y en el endotelio respectivamente, y su actividad está regulada por el Ca^{+2} . Por su parte la isoforma iNOS se expresa en función de diversos estímulos y no se encuentra regulada por el Ca^{+2} . Esta isoforma es la responsable de la mayor parte de la producción de óxido nítrico y se ha identificado en varias poblaciones celulares, células gliales, células vasculares, neutrófilos infiltrados en el tejido cerebral además de en neuronas tanto corticales como cerebrales³⁰.

La isquemia causa la sobreproducción de NO en el cerebro como consecuencia de la sobreactivación de las tres isoformas de la NOS. A su vez, la sobreactivación de las isoformas eNOS y nNOS se produce por el incremento en la concentración intracelular de Ca^{+2} , mientras que la forma inducible de la NOS no presenta este tipo de control, sino que se encuentra regulada en mayor o menor medida por diferentes mediadores implicados en el proceso inflamatorio. Parece ser que la acción de la eNOS es beneficiosa, mientras que la acción de la nNOS y la iNOS es tóxica. Los efectos nocivos del óxido nítrico se pueden centrar en tres aspectos fundamentales:

1. Formación de peroxinitrito, que contribuye al estrés oxidativo produciendo en última instancia la peroxidación lipídica de las membranas celulares.

2. Inhibición enzimática de diferentes rutas antioxidantes como la glutatión peroxidasa, diferentes enzimas metabólicas como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, además de actuar sobre la cadena respiratoria mitocondrial³¹.
3. Intensificación de la excitotoxicidad. El NO modula la fusión de vesículas a la membrana y libera neurotransmisores como el glutamato.

En cuanto a la inflamación propiamente dicha, la mayoría de resultados demuestran que ésta contribuye a la progresión del daño cerebral, al menos en su fase aguda. Esta reacción inflamatoria se manifiesta de manera más evidente cuando a la isquemia le sigue la reperusión del tejido hipoperfundido, y se caracteriza fundamentalmente por dos procesos: infiltración de leucocitos circulantes en la sangre hacia el tejido cerebral y activación de la microglía.

Debido a la reperusión del tejido dependiente del vaso ocluido, ya sea por compensación por la circulación colateral, ya sea por recanalización espontánea o terapéutica, se generan radicales libres y ROS.

En las células endoteliales, las ROS promueven la expresión de múltiples elementos: receptores de moléculas de adhesión, como las selectinas; moléculas de adhesión intercelular, como los ICAMs; elementos proangiogénicos, como el VEGF y diferentes integrinas. Parte de estas respuestas provocan que la BHE y la matriz extracelular pierdan su integridad, y franqueen el paso de los leucocitos circulantes previamente adheridos al endotelio hacia el tejido cerebral (*Figura 9*). En estas condiciones, el cerebro deja de ser un órgano que presenta un “privilegio” inmune, para convertirse en un órgano como cualquier otro, susceptible de sufrir un proceso inflamatorio.

Una vez infiltrados en el parénquima cerebral, los leucocitos promueven el daño neuronal liberando sustancias citotóxicas que se suman a las segregadas por las células de la glía.

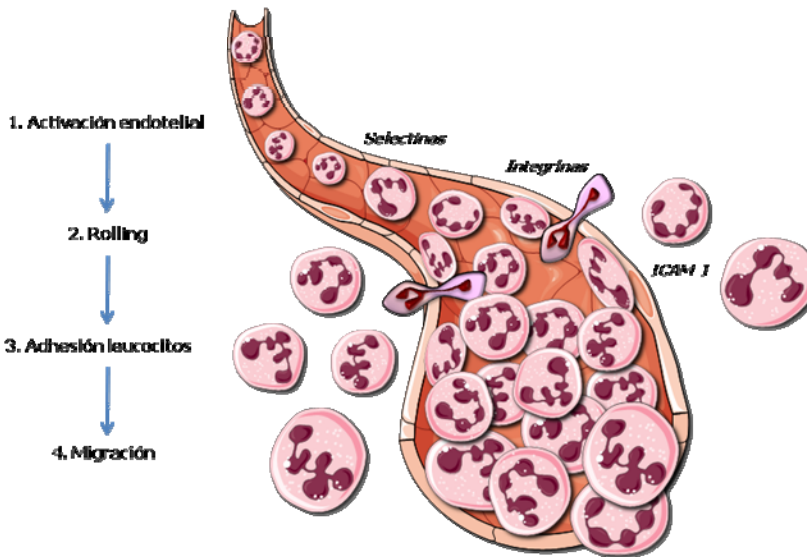


Figura 9. Proceso de diapédesis de los leucocitos a través de la pared endotelial.

Las células de la microglía son los macrófagos residentes del cerebro, y llevan a cabo funciones como células inmunocompetentes y fagocíticas. Sin embargo, tras la isquemia, la microglía sufre una transformación morfológica que las convierte en fagocitos, y no se pueden distinguir de los macrófagos. Por otra parte, los astrocitos, durante la isquemia, también sufren una activación, produciendo astrocitos reactivos que expresan la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), exhibiendo, además el fenómeno de gliosis reactiva. Dicho fenómeno se caracteriza por cambios funcionales y estructurales, aumentando la expresión de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y neuropéptidos. Tanto los leucocitos, especialmente los neutrófilos, como las células

endoteliales y las células de la glía producen citoquinas, como la IL-1 y la IL-6 y el TNF- α . La microglía posee, además, una gran capacidad sintética de mediadores neurotóxicos: radicales libres, aminoácidos excitotóxicos además de enzimas proteolíticas activados. Citoquinas como el TNF- α , interleuquinas, como la IL-1 β , la IL-2, la IL-6, la IL-10, histamina, trombina, PAF, proteínas quimiotácticas monocíticas (MCP), la proteína inflamatoria 1 de macrófagos (MIP-1) entre otras, son también sintetizadas y liberadas al plasma.

Otras consecuencias de la reperusión son la formación de edema, la inducción de fenómenos de coagulación y la angiogénesis. Los dos primeros fenómenos contribuyen al “fenómeno de no reflujo”, por el cual los microvasos permanecen obstruidos tras liberarse la oclusión que inicialmente causaba la isquemia³².

1.2. EDEMA CEREBRAL

1.2.1. Fisiopatología del edema cerebral

Hablamos de edema cerebral para referirnos a la hinchazón que ocurre en el parénquima cerebral debido a la acumulación de líquido³³. Constituye el factor que más contribuye en la morbilidad y mortalidad del ictus³⁴. En pacientes con infartos graves el edema producido puede ocasionar un aumento de la presión intracraneal que conduzca a la herniación, disminución del nivel de consciencia y muerte³⁵. Incluso en infartos más pequeños el edema puede producir un aumento en la presión intracraneal, lo que a su vez incrementa la isquemia³⁶.

En los primeros momentos (*Figura 10*), y en presencia de isquemia cerebral aguda el transporte iónico dependiente de ATP fracasa (entra Na^+ , Ca^{+2} , Cl^- y sale K^+) y, a consecuencia de ello, los astrocitos sufren unos minutos de hipoxia y se hinchan. Para mantener el equilibrio osmótico celular, el agua se desplaza desde el compartimento intersticial al intracelular y se recapta desde el compartimento sanguíneo al parénquima cerebral. Este tipo de edema se desarrolla pocos minutos y pocas horas después de la isquemia cerebral, y aunque puede ser un proceso reversible, predispone al cerebro a un daño posterior debido al incremento de la actividad de aminoácidos excitotóxicos y radicales libres y al consecuente fallo en la homeostasis intracelular con alteración en la membrana plasmática.

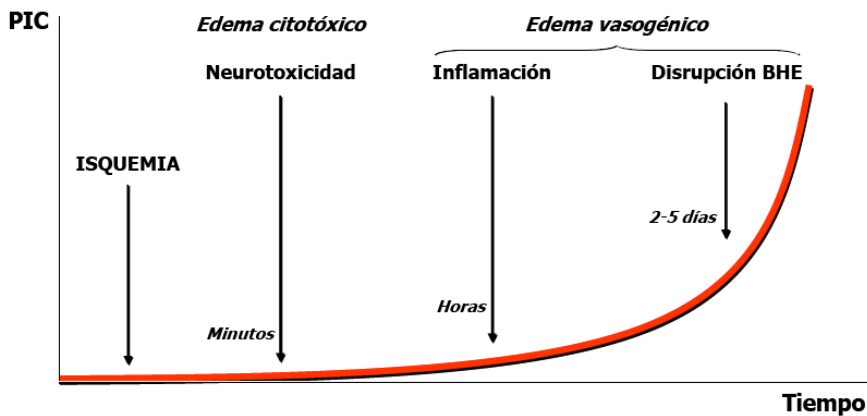


Figura 10. Desarrollo temporal del edema cerebral tras el episodio isquémico.

En el edema citotóxico la acumulación intracelular de agua afecta a todos los elementos celulares del cerebro, con predominio sobre la sustancia gris³⁷, sin alteración medible de la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE).

En cambio, el edema vasogénico, principalmente localizado en la sustancia blanca, se produce por la alteración de la barrera hematoencefálica debido a la persistencia de la isquemia cerebral. Como consecuencia de esta alteración de la barrera hematoencefálica, se produce una extravasación de proteínas en el parénquima cerebral, lo que da lugar a un acúmulo de líquido en el espacio intercelular³⁸. Días después del desarrollo de la isquemia, el acúmulo de proteínas en la sustancia blanca es más intensa que en el propio tejido isquémico, donde la mayoría de las proteínas han sido digeridas por enzimas proteolíticos.

En condiciones fisiológicas, los astrocitos ejercen un papel regulatorio mediante los pies astrocitarios que contribuyen física y funcionalmente a esta barrera, además de regular la expresión y la función de varios de sus transportadores. Siendo más permeable a proteínas como la albúmina, el endotelio del capilar favorece la entrada de líquido desde el torrente sanguíneo hasta el espacio intersticial por diferencias de presión hidrostática, dando como resultado la acumulación de fluidos y proteínas séricas en el espacio intersticial³⁸.

En este aumento de la permeabilidad, juegan un papel importante las uniones que se establecen entre las células endoteliales. Estas uniones, junto con los astrocitos constituyen la estructura de la barrera hematoencefálica, estas están compuestas por una intrincada combinación de proteínas transmembrana y citoplasmáticas unidas al citoesqueleto de actina, que facilita la formación de un sello. Existen dos grandes tipos de complejos que forman las uniones: uniones estrechas y uniones adherentes.

Las uniones estrechas constan de al menos tres proteínas transmembrana, las claudinas, la ocludina y las JAM (Junctional Adhesion Molecules)³⁹ (*Figura 11*). De ellas, las claudinas parecen constituir el esqueleto de las uniones estrechas. Forman dímeros y se unen homotípicamente a otras claudinas presentes en células endoteliales adyacentes, con el objetivo de formar el primer sello de la unión estrecha.

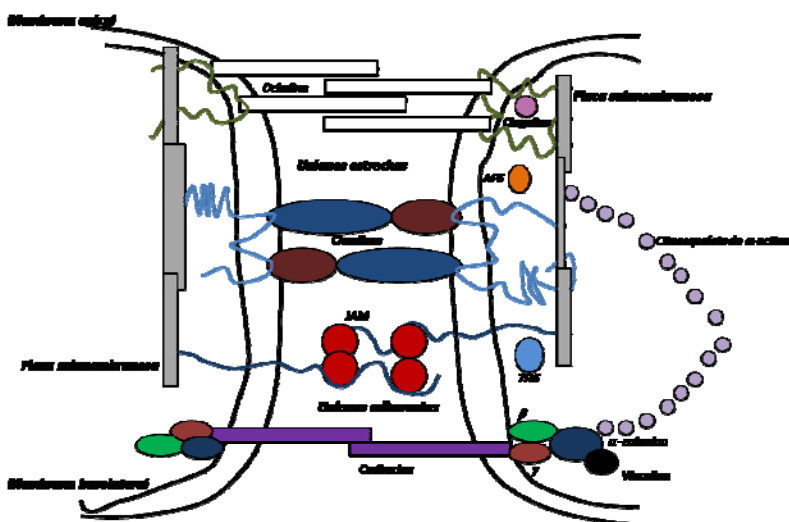


Figura 11. Esquema de los complejos de unión.

En las células endoteliales de mamíferos únicamente se identificaron la Claudina-1 y la Claudina-5, de las cuales la Claudina-5 se halló en células endoteliales de vasos sanguíneos, particularmente en las células endoteliales de los capilares cerebrales⁴⁰.

La Ocludina es una proteína membrana integral de 60-kDa con cuatro segmentos transmembrana^{41,42}. Tanto el extremo carboxiterminal como

el aminoterminal están localizados intracelularmente. Los dos loops extracelulares de la Ocludina comprenden 45 aminoácidos. El primer loop tiene una alta proporción de residuos de tirosina y glicina, indicando un papel de este dominio en la adhesión célula-célula, contribuyendo de esta manera al aumento de la resistencia eléctrica que se produce a través de la BHE.

Las JAM (Junctional Adhesion Molecule) constituyen el tercer tipo de proteínas transmembrana de las uniones estrechas. Se han identificado tres proteínas relacionadas con las JAM, que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. JAM tiene un único dominio transmembrana y su dominio extracelular está constituido por dos loops como el de las inmunoglobulinas. Las proteínas JAM están implicadas en la adhesión célula-célula y contribuyen al control de la permeabilidad tanto como a la extravasación de los monocitos^{43,44}.

Asociadas con las proteínas de unión estrecha propiamente dichas, existen otras proteínas encargadas de fijar los complejos proteicos al citoesqueleto de la célula. Entre estas proteínas podemos citar las que pertenecen a la familia de ZO (Zonula Occludens). Se han identificado como miembros de esta familia la ZO-1, la ZO-2 y la ZO-3⁴⁵. Estas proteínas forman la placa submembranosa de las uniones estrechas. Estas proteínas pertenecen a la familia MAGUK (Membrane Associated Guanylate Kinase)⁴⁶. Presentan además, dominios encargados del acoplamiento de las proteínas transmembrana al citoesqueleto de actina de la célula, de tal forma que las ZO se unen directamente a las claudinas y a los filamentos de actina desempeñando de esta manera funciones estructurales y dinámicas.

Otras proteínas presentes en las uniones estrechas, son el antígeno 7H6, que en respuesta a la depleción del ATP celular se disocia reversiblemente de la unión, lo cual se asocia con un aumento de la permeabilidad, mientras que ZO-1 permanece anclado; la cingulina, proteína fosforilada de 140-160 kDa, que se acopla con las diferentes ZO, miosina y AF-6 sugiriendo que la cingulina podría funcionar como un andamiaje en la superficie citoplasmática de las uniones estrechas^{47,48}.

En cuanto a las uniones adherentes, éstas forman un cinturón continuo, cuya función principal es la de sostén de células vecinas próximas⁴⁹. Las uniones adherentes están compuestas de glicoproteínas transmembrana de la superfamilia de las cadherinas, que son receptores Ca^{+2} dependientes que forman complejos adhesivos homotípicos con células vecinas. Las glicoproteínas están ligadas al citoesqueleto de actina por proteínas de anclaje citoplasmáticas, β -catenina, γ -catenina y la p120^{ctn} que pertenecen a la familia de proteínas Armadillo⁵⁰.

En condiciones fisiológicas el endotelio microvascular del cerebro actúa como una barrera al sistema inmune limitando la entrada de monocitos, linfocitos y otros leucocitos. Sin embargo en patologías como la isquemia cerebral, ocurre la rotura de la BHE, asociada con la migración de numerosos neutrófilos, linfocitos o monocitos⁵¹.

Ha habido diferentes estudios en los que se ha discutido la importancia de las uniones estrechas en el proceso de migración de células inflamatorias hacia el parénquima cerebral, existiendo diversas hipótesis, destacando la que afirma que la migración celular alteraría la estructura de las uniones estrechas, de forma que las uniones estrechas se deberían de abrir y cerrar durante el proceso de migración⁵².

Por el contrario, estudios más recientes afirman que las proteínas de unión estrecha ZO-1, ZO-2 y ocludina permanecen asociadas en los extremos de la célula y su estructura no se ve afectada durante la adhesión y migración de los neutrófilos activados⁵³.

Además, la adhesión de los neutrófilos y la migración no afecta a la ultraestructura del endotelio ni a su resistencia transeleétrica. Se ha sugerido que los neutrófilos migrarían preferentemente a través de los bordes tricelulares donde convergen tres células y las uniones estrechas son discontinuas. Por tanto, bajo condiciones fisiológicas, los cambios netos en la permeabilidad vascular en los contactos célula-célula son insignificantes. Sin embargo, en una situación de daño masivo, la permeabilidad del endotelio del capilar a las macromoléculas aumenta, entra líquido y el espacio intersticial se expande, correspondiéndose con el desarrollo de la fase vasogénica del edema, considerándose un proceso de daño irreversible. A nivel de las proteínas de unión estrecha, el aumento de la permeabilidad se correlaciona con una redistribución de las proteínas de unión estrecha de la membrana plasmática al citoplasma. Probablemente esté causada por la falta de procesos dependientes de energía necesarios para mantener la función de barrera⁵⁴.

En esta etapa vasogénica, participan además, proteasas como las MMP, familia de enzimas proteolíticas extracelulares que degradan la matriz extracelular. Son producidas por células endoteliales, microglía y astrogía en respuesta al daño cerebral (**Figura 12**).

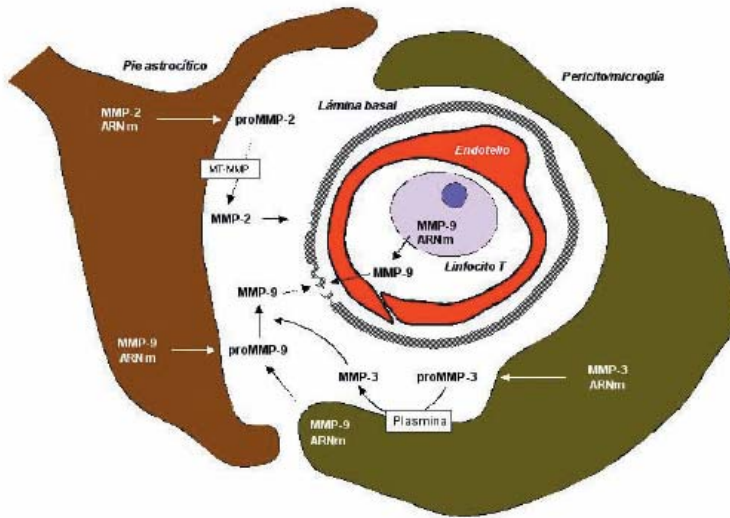


Figura 12. Producción y efecto de las MMPs sobre la matriz extracelular.

Se conocen cinco clases y sólo las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) aumentan su expresión en astrocitos tras un episodio de isquemia focal permanente^{29,55,56}. Ambas MMPs están involucradas en la alteración de la permeabilidad de la BHE y en la formación del edema vasogénico después de la isquemia cerebral focal.

También cabe destacar en el efecto final de formación del edema, la apertura de canales específicos de agua o acuaporinas. Están englobadas en una familia de proteínas conocidas con el acrónimo WCP (Water Channel Protein). Son proteínas transmembrana que tienen una estructura tridimensional con un poro permeable a las moléculas de agua. La primera WCP fue hallada en la membrana de eritrocitos humanos en la década de 1980⁵⁷. Ya en 1990, otras WCPs fueron descubiertas en microorganismos, varias plantas y mamíferos⁵⁸. Dentro de la familia de las WCPs podemos distinguir varias subfamilias

atendiendo al soluto que transportan y a su localización celular. Así, las acuaporinas son específicas para el transporte del agua a través de las membranas celulares. Otra subfamilia la constituyen las acuagliceroproteínas o también llamadas facilitadoras del transporte de glicerol, permeables al agua y a otras pequeñas moléculas. Por último una tercera subfamilia la constituyen las acuaporinas subcelulares donde estarían incluidas las SIPs (Small basic Intrinsic Proteins)^{59,60}.

En los mamíferos se han encontrado 13 miembros de la familia de las AQP (AQP 0-12)⁶¹. Las AQP son monómeros que constan de seis dominios transmembrana con los extremos carboxiterminal y aminoterminal en el interior celular⁶¹⁻⁶⁴ (**Figura 13**). Su conformación activa está formada por tetrámeros, donde cada monómero contiene un poro conductor de solutos o agua⁶⁵. El transporte de agua vía AQP es bidireccional, conducido por la diferencias de las presiones hidrostática y osmótica, entre el espacio intra y extracelular. La intensidad del transporte también viene condicionada por la permeabilidad de un simple canal, o por su abundancia en la membrana celular. Ambos parámetros pueden ser regulados. La regulación de las AQP, ocurre principalmente a través de dos mecanismos:

- a) A corto plazo. Conocida como regulación dinámica. Esta regulación puede estar mediada por cambios conformacionales del canal que pueden ser resultado de una fosforilación-desfosforilación, cambios en el estado de protonación de ciertos aminoácidos de la estructura de las AQP, interacciones proteína-proteína o unión a ciertos metales pesados como el Hg o el Cu. Como resultado de esta regulación, la permeabilidad del canal de la AQP o la localización subcelular de la AQP puede variar,

produciendo cambios inmediatos, en segundos o minutos, en la permeabilidad de la membrana.

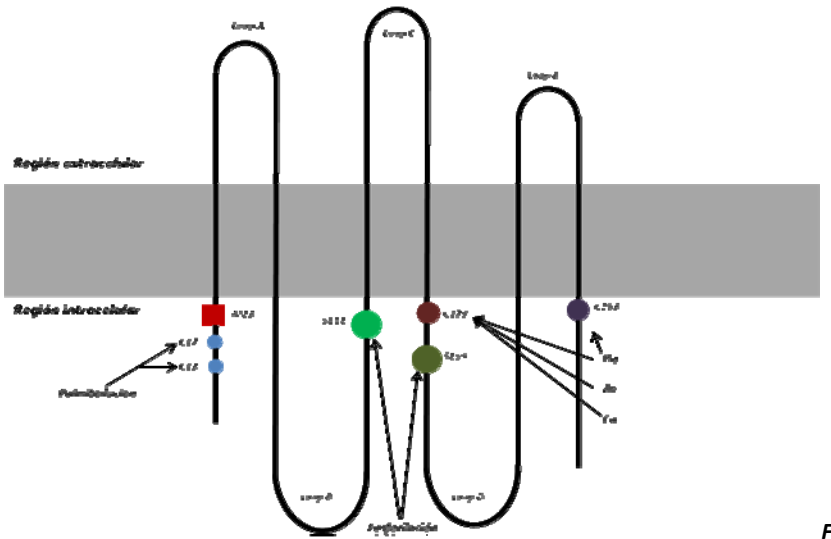
- b) A largo plazo. Mediada por cambios en los mensajeros de las AQP's y en las tasas de síntesis/degradación de las proteínas. Esta regulación produce cambios, en un tiempo de horas o días, que se traducen en el grado de abundancia de AQP's y por tanto en la permeabilidad de la membrana donde se localice la AQP⁶⁶.

En el cerebro de los mamíferos se han encontrado principalmente 3 AQP's distintos: AQP 1, AQP4, AQP9. De ellas, la AQP1 es la única que no se encuentra a nivel de los astrocitos, expresándose en células epiteliales del plexo coroideo^{67,68}. Su función es la formación del LCR.

La mayor parte de los estudios sobre la función de las AQP's están basados en el uso de animales knockout, de forma que no expresan la AQP de interés, así se sabe que la AQP4 juega un papel muy importante en el desarrollo del edema subsiguiente a la isquemia, trauma o en la inflamación de tumores^{69,70}. Parece ser que el efecto de la AQP4 sobre el edema cerebral es diferente dependiendo del momento de desarrollo del edema. Los ratones knockout para el gen de la AQP4 son menos propensos a desarrollar edema cerebral citotóxico^{69,71,72}. Sin embargo, la delección de la AQP4 agrava el edema cerebral vasogénico. En el edema citotóxico, la delección de AQP4 disminuye el ritmo de entrada de agua al cerebro, mientras que en el edema vasogénico la delección de AQP4 reduce el ritmo de salida del agua del cerebro. Acorde con esto, la sobreexpresión de AQP4 en ratones transgénicos acelera el hinchamiento cerebral citotóxico⁷³.

En cuanto a la regulación de la AQP4, la fosforilación de distintos aminoácidos provoca efectos antagónicos en la permeabilidad de la

En cuanto a la AQP9, se sabe que además de expresarse en los astrocitos, es la única AQP que se expresa en las neuronas cerebrales, de hecho su mayor expresión se encuentra en neuronas catecolaminérgicas, incluyendo las adrenérgicas, las noradrenérgicas y las dopaminérgicas⁷⁷.



F

La expresión de la AQP9 en los pies astrocíticos sugiere que esta proteína también está implicada en la homeostasis del agua en el cerebro. Sin embargo sus funciones con respecto a patologías como el edema cerebral son más confusas, la mayor parte de los hallazgos se han obtenido en patologías como diabetes⁷⁸, debido a que la AQP9 está implicada en el metabolismo energético cerebral, ya que transporta importantes moléculas metabólicas como glicerol o diferentes monocarboxilatos.

En cuanto a su regulación, al igual que la AQP4, se encuentra regulada por diferentes proteínquinasas mediadas por fosforilaciones en diferentes residuos de la estructura aminoacídica⁷⁹.

1.2.2. Diagnóstico y tratamiento del edema: limitaciones

El edema citotóxico que se origina como consecuencia de la activación de los receptores AMPA por los aminoácidos excitatorios es responsable de los cambios más precoces que se pueden identificar en la tomografía computerizada, conocidos como signos precoces. El método ASPECTS fue diseñado para evaluar los signos precoces de isquemia en pacientes con ictus isquémico agudo de la circulación anterior (<3 horas desde el inicio de los síntomas) utilizando un TC estándar con un sistema de medición reproducible. La escala divide el territorio de la ACM en 10 regiones de interés de forma que cuando una región se ve afectada se resta de la escala, siendo el edema cerebral más grave el determinado por una puntuación de 0⁸⁰⁻⁸² (*Figura 14*).

Una de las principales aplicaciones que tiene el uso de la escala ASPECTS, es la selección de pacientes para el tratamiento trombolítico. La

reperusión del cerebro isquémico es la terapia más efectiva para el ictus isquémico agudo conocida hasta el momento⁸³. Aprovechando su actividad fibrinolítica el tPA es utilizado en la clínica humana, con una ventana terapéutica de 3 horas, para la trombólisis del coágulo causante del infarto cerebral, mejorando el pronóstico funcional de los pacientes. Al restaurar el flujo sanguíneo y por tanto el oxígeno y los nutrientes en el tejido antes de que se dañe irreversiblemente, se consigue reducir el tamaño final del infarto y mejorar el pronóstico funcional.

Sin embargo, la estrategia de reperusión posee diversas limitaciones, entre las que se encuentran la corta duración de la ventana terapéutica, el daño neuronal o el riesgo de transformación hemorrágica. Por tanto, debido a los efectos potencialmente tóxicos del tPA, tan sólo entre el 1% y 3% de los pacientes se benefician de la terapia trombolítica actualmente⁸³⁻⁸⁶.

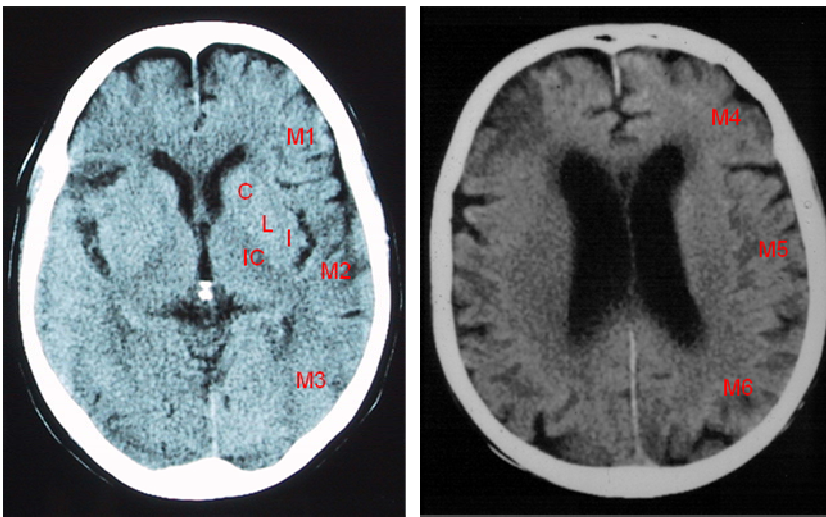


Figura 14. Diferentes regiones que se definen en el método ASPECTS. C: núcleo caudado; L: núcleo lentiforme; IC: cápsula interna; I: cinta insular; M1: córtex de la ACM anterior; M2: córtex de la ACM lateral a la cinta insular; M3: córtex posterior a la ACM; M4; M5 y M6: territorios de la ACM anterior, lateral y posterior inmediatamente superior al territorio M1, M2 y M3, rostral a los ganglios basales.

Debido a que el tPA induce edema y ruptura de la BHE, es necesario algún tipo de método que permita determinar el riesgo que sufre un determinado paciente ante el tratamiento trombolítico. Se ha demostrado la asociación entre la escala ASPECTS, evaluada antes del tratamiento trombolítico, y el mal pronóstico funcional a los 3 meses, de forma que aquellos pacientes con mayor número de áreas afectadas, tendrán peor pronóstico, no debiéndoseles administrar tPA^{81,82} (**Figura 15**).

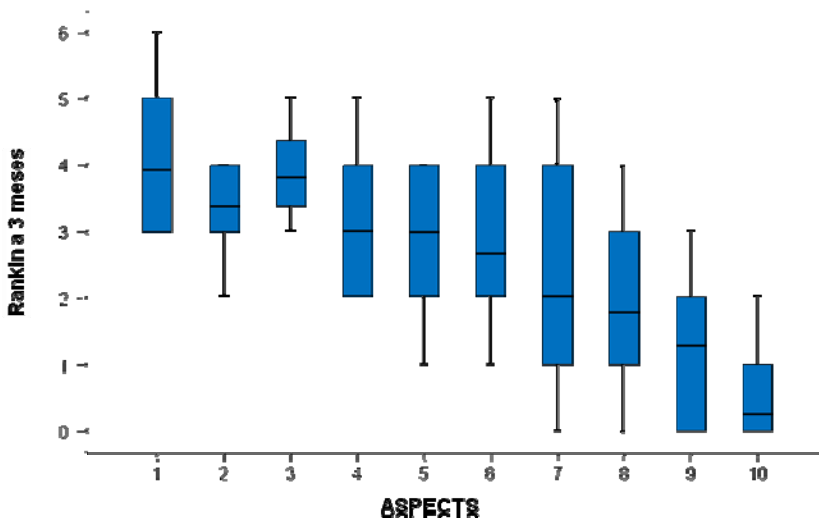


Figura 15. Relación entre la escala ASPECTS y el pronóstico a los 3 meses.

Por tanto, el método ASPECTS nos proporciona una escala numérica del grado de edema que presenta un paciente, sin embargo, la principal limitación que presenta este método es que la clasificación del edema cerebral puede ser sugestiva pero no específica, ya que la neuroimagen es orientativa pero no específica.

Por otro lado, las líneas de actuación generales para el tratamiento del edema están centradas en optimizar la perfusión, oxigenación y el drenaje venoso, así como minimizar las demandas metabólicas del cerebro, y evitar las intervenciones que puedan exacerbar los gradientes osmótico e iónico.

El tratamiento del edema se puede abordar desde diferentes aproximaciones, destacando entre otras⁸⁷:

1. Terapia hiperosmolar, con agentes como el manitol, suero salino hipertónico o el glicerol.

a) Manitol. Actúa principalmente como un agente osmótico arrastrando el agua de los espacios intersticial e intracelular del cerebro a través de la BHE. Además el manitol puede mejorar el flujo sanguíneo microvascular por hemodilución y aumentar la plasticidad de los eritrocitos con una reducción subsiguiente del volumen sanguíneo cerebral y la PIC vía vasoconstricción. El manitol puede también aumentar la presión de perfusión cerebral por un aumento en la presión arterial media, lo cual en cambio puede causar vasoconstricción cerebral con la consiguiente reducción en el volumen sanguíneo cerebral y en la PIC⁸⁸.

Numerosos estudios experimentales han investigado los efectos del manitol en la isquemia cerebral focal y en la formación del edema en varios modelos animales, pero los resultados no han sido consistentes. La mayoría de las investigaciones encontraron efectos beneficiosos del manitol intravenoso con respecto al volumen del infarto, a la formación del edema y la PIC elevada⁸⁹⁻

91

Sin embargo, a la hora de la administración a pacientes hay que tener en cuenta una serie de precauciones. Teóricamente, la efectividad de la osmotherapia depende de una BHE intacta y las soluciones hipertónicas pueden causar una alteración del hemisferio normal donde la BHE todavía está intacta, con un empeoramiento subsiguiente del desplazamiento del tejido. La importancia clínica de este fenómeno permanece confusa y los pocos datos disponibles en humanos no son consistentes^{92,93}. Además, se ha constatado la acumulación del manitol en el tejido cerebral dañado después de dosis repetidas en un modelo animal de isquemia, causando una reversión del gradiente osmótico y un agravamiento del edema cerebral⁹⁴. Estos posibles efectos adversos han de tenerse en cuenta también con los otros agentes osmóticos.

Dada la falta de ensayos clínicos sistemáticos en pacientes de ictus, no hay información clara en el momento óptimo, dosis y programa de aplicación del manitol. El objetivo sería conseguir una osmolaridad sérica que esté dentro del intervalo de 310 y 320 mOsm/L. Sin embargo esta práctica no está apoyada por estudios experimentales o clínicos⁸⁸.

- b) Suero salino hipertónico. Durante los últimos años se ha ido aumentado el uso de soluciones salinas hipertónicas como una alternativa al manitol para controlar el edema cerebral. Como en el caso del manitol, varios mecanismos parecen ser responsables de la reducción del edema cerebral alcanzado con el suero salino hipertónico. Ya que el cloruro de sodio no puede atravesar la BHE

intacta, se ha propuesto que las soluciones salinas hipertónicas pueden ser un agente osmótico mucho más favorable que el manitol. Además el suero salino tiene el efecto de expandir el volumen intravascular con un aumento en la presión arterial media produciendo un aumento en la CPP, mientras que el manitol es un diurético osmótico que produce secundariamente depleción del volumen. Otros mecanismos de acción propuestos incluyen la modulación de la respuesta inflamatoria y la excitabilidad neuronal así como una oxigenación mejorada⁹⁵. Los estudios experimentales que comparan las soluciones salinas hipertónicas con el manitol en diferentes modelos de lesión cerebral han proporcionado datos conflictivos con respecto a las propiedades antiedema e hipotensoras de la PIC⁹⁶. Se ha demostrado en algunos estudios aleatorizados que el suero salino hipertónico parece ser más efectivo al bajar la PIC que el manitol⁹⁷. Sin embargo, no se puede sacar ninguna conclusión hasta el momento ya que los estudios experimentales y clínicos usaron una amplia variedad de concentraciones salinas y soluciones equiosmolares.

En contra del uso sin restricción del suero salino hipertónico está el riesgo de complicaciones atribuibles a una hiponatremia grave, aunque estas complicaciones son más bien teóricas y se han observado muy raramente en estudios clínicos. Otros efectos secundarios del uso de soluciones salinas pueden ser: fallo cardíaco congestivo y edema pulmonar, acidosis hiperclorémica, hipocalcemia e hipomagnesemia.

- c) Glicerol. El glicerol es otro agente osmótico que también tiene acciones neuroprotectoras. Se ha postulado que la administración de glicerol mejora el flujo sanguíneo en territorios isquémicos y aumenta el metabolismo del cerebro isquémico⁹⁸. El glicerol presenta la ventaja sobre otros agentes osmóticos de que es metabolizado por el cerebro tan pronto como cruza la BHE, reduciendo de esa manera la posibilidad de la aparición de edema de rebote⁹⁹. Además, el glicerol casi no tiene efectos secundarios¹⁰⁰. El glicerol, en suma, resulta uno de los tratamientos más frecuentes utilizados para el ictus. La terapia con glicerol parece tener un efecto beneficioso en la supervivencia a corto plazo de los pacientes, sin embargo, no hay estudios suficientes que permitan observar el pronóstico a largo plazo.
2. Barbitúricos. El principal efecto de los barbitúricos consiste en una disminución del metabolismo cerebral. El grado metabólico reducido y la reducción subsiguiente del volumen sanguíneo cerebral y el flujo sanguíneo cerebral pueden, en teoría, reducir la formación del edema y bajar la PIC. El uso de altas dosis de barbitúricos se asocia frecuentemente con complicaciones graves como la hipotensión, disfunción hepática y un aumento del riesgo de infecciones. Hay muy pocos datos acerca del uso de barbitúricos en el edema cerebral tras un infarto grave. En algunos estudios, realizados en los años 70 y 80 del siglo pasado, lo que se constata es una bajada de la PIC tras la administración de los barbitúricos^{101,102}. Por tanto en pacientes con infartos graves, los barbitúricos sólo parecen ofrecer beneficios

limitados y a corto plazo que pueden ser contrarrestados por efectos secundarios graves.

3. Hiperventilación. La hiperventilación disminuye la PIC por inducción de la vasoconstricción cerebral, con una disminución subsiguiente del volumen sanguíneo cerebral y del flujo sanguíneo cerebral. La principal desventaja de la hiperventilación es que la vasoconstricción cerebral puede disminuir el flujo sanguíneo a niveles isquémicos.
4. Ketorolaco. Se supone que actúa entrando en el espacio de la médula espinal neutralizando la vasodilatación inducida por la acidosis, reduciendo por tanto la PIC. Se han demostrado en modelos animales de daño cerebral las propiedades hipotensoras de la PIC así como los efectos beneficiosos en la formación del edema. En modelos animales de isquemia la administración de ketorolaco se ha asociado con una reducción significativa del tamaño del infarto, edema cerebral y de la concentración de lactato¹⁰³. Sin embargo, no hay estudios sobre el uso de ketorolaco en pacientes con ictus isquémico. A pesar de ello, algunos autores apoyan la administración de ketorolaco como una opción para el tratamiento del edema cerebral^{104,105}.
5. Indometacina. La indometacina es un potente vasoconstrictor cerebral que también exhibe efectos antit inflamatorios y antiedematosos. La capacidad hipotensora de la indometacina se ha descrito en pocos casos en trauma cerebral. Debido a la falta de

estudios clínicos sistemáticos, la aplicación del tratamiento con indometacina permanece en fase experimental.

6. Furosemida. Los diuréticos del asa como la furosemida pueden actuar disminuyendo el volumen del agua corporal total y aumentando la osmolaridad sanguínea, eliminando por tanto el agua del cerebro. Existen pocos datos acerca del uso de la furosemida en el edema cerebral, y los resultados son inconsistentes.
7. Otras aproximaciones. Hipotermia y cirugía descompresiva. En el caso de la hipotermia, ésta ejerce efectos neuroprotectores múltiples y sinérgicos. La hipotermia reduce el grado metabólico cerebral, estabiliza la BHE, reduce el edema cerebral, la formación de radicales libres, y la liberación de neurotransmisores excitotóxicos, y atenúa la respuesta inflamatoria postisquémica. Otra opción terapéutica puede ser la cirugía, encaminada a reducir la presión intracraneal, limitada a aquellos pacientes en los que la terapia convencional se ha mostrado ineficaz. Sin embargo, existe controversia sobre si esta medida terapéutica mejora el pronóstico de los pacientes tratados¹⁰⁶.

Pese a todo ello, el edema sigue constituyendo la principal causa de muerte en pacientes con grandes infartos, por lo que los tratamientos anteriormente citados son ineficaces. En conclusión, ninguno de los tratamientos actuales para el edema cerebral ha demostrado beneficio, por lo que es imperativa la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas del edema cerebral en el ictus isquémico.

1.2.3. Endotelina-1, antagonistas y edema cerebral

La endotelina-1 forma parte de la familia de las endotelinas (ET-1, ET-2, ET-3), péptidos regulatorios que tienen efectos vasoconstrictores y presores de larga duración^{107,108}. De ellas, la ET-1 es la más activa, producida en las células endoteliales y desempeñando una importante función en la regulación de la función cardiovascular. La ET-1 biológicamente activa, se genera dentro de la célula en un proceso proteolítico de 2 pasos a partir de un péptido precursor de aproximadamente 200 aminoácidos conocido como preproET-1¹⁰⁹. Una peptidasa corta la preproET-1 para generar un precursor todavía inactivo, llamado gran ET-1, que más tarde será convertido a ET-1 por las enzimas conversoras de ET-1¹¹⁰⁻¹¹². La producción de la ET-1 (ET-1) está regulada a nivel génico. Su expresión es estimulada por diversos factores físicos y químicos, como hipoxia, angiotensina II, diversos factores de crecimiento y otras citokinas¹¹³. Todos estos factores provocan un aumento en la movilización de Ca^{+2} intracelular. Por el contrario, entre los factores que provocan la inhibición de su síntesis, están el óxido nítrico (NO), péptidos natriuréticos, prostaciclina, heparina y un flujo sanguíneo elevado. Muchos de los factores estimulantes actúan a través de la activación de diversas rutas como la de la fosfolipasa C/proteínquinasa C, mientras que los efectos inhibitorios están mediados por la inhibición del metabolismo del fosfoinositol¹¹⁴.

Las células endoteliales liberan ET-1 predominantemente abluminalmente, y ésta actúa mayoritariamente de una manera

autocrina a nivel local, y como un factor paracrino, más que como una hormona endocrina¹¹⁵.

Existen 2 tipos de receptores, el ETR_A y el ETR_B, responsables de los efectos biológicos inducidos por las endotelinas. Se ha demostrado su expresión en todas las células de la unidad neurovascular¹¹⁶. En concreto, en los vasos sanguíneos, los receptores ETR_A están localizados principalmente en las células musculares lisas, además de en las células endoteliales, mediando vasoconstricción. Por el contrario los receptores ETR_B, presentan 2 subpoblaciones diferentes dependiendo de la localización y la función que tengan en la regulación del flujo sanguíneo. Así, el ETR_{B1}, se expresa en las células endoteliales vasculares y media vasodilatación, y el ETR_{B2} está localizado en las células musculares lisas y causa vasoconstricción¹¹⁷. Por otro lado se ha demostrado que el receptor ETR_{B2}, localizado en órganos periféricos parece tener un importante papel en la eliminación de la ET-1 circulante¹¹⁸.

Estos receptores son proteínas con 7 dominios transmembrana acoplados a proteínas G con una alta homología estructural¹¹⁹.

La ET-1 provoca la activación de diversas rutas de señalización intracelular dependiendo del receptor al que se unan. En concreto la activación de los receptores ETR_A conduce a la activación de la fosfolipasa C y la generación del inositol 1, 4, 5-trifosfato y el diacilglicerol (DAG), el cual activa la proteína Kinasa C, que provocaría un aumento en la concentración intracelular de Ca⁺².

Las acciones de la ET-1 no sólo se limitan a los efectos regulatorios del tono vascular, sino que también promueven la adhesión de los leucocitos, el aumento de la permeabilidad de la barrera

hematoencefálica, además de un aumento en la inflamación¹²⁰ (Figura 16).

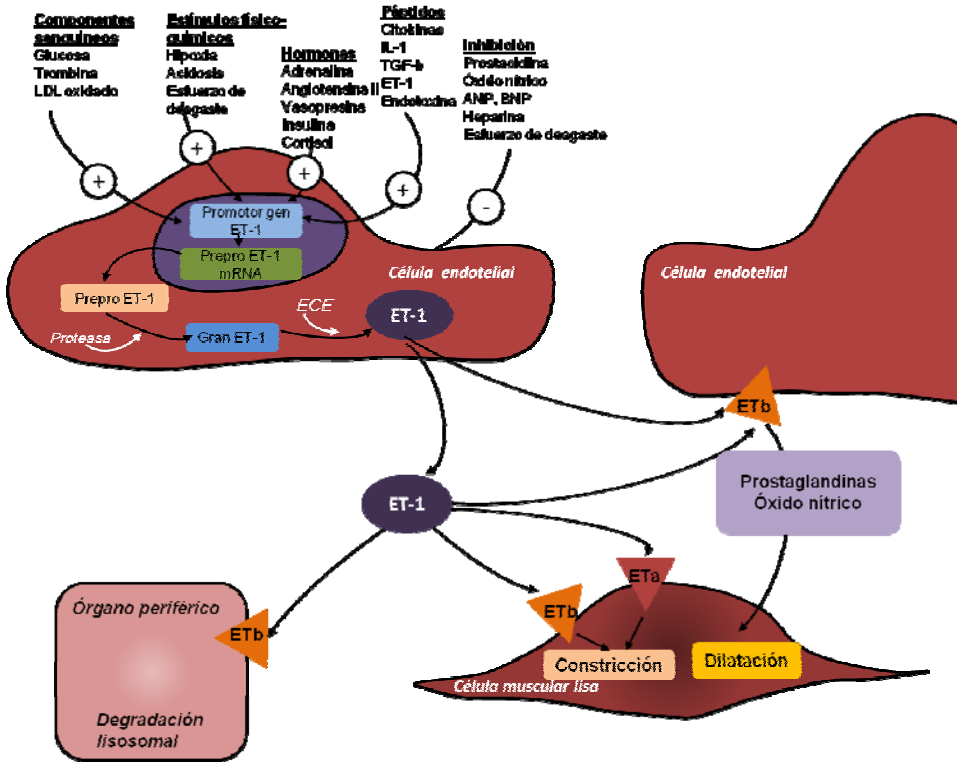


Figura 16. Efectos fisiológicos de la ET-1.

En condiciones normales, la ET-1 no parece contribuir al flujo sanguíneo cerebral, sugiriendo que la ET-1 no se libera de forma normal del endotelio cerebrovascular¹²¹. En estados fisiopatológicos, sin embargo, el sistema de la ET-1 se activa y puede contribuir a la disfunción vascular y al daño cerebral. Se ha demostrado que tanto la síntesis de ET-1 como la expresión de los receptores se encuentran sobreexpresadas en células endoteliales cerebrales tras la isquemia/reperfusión¹²².

Existen varios estudios en diferentes patologías, cuyo principal objetivo es valorar la eficacia de varios antagonistas específicos del receptor ETR_A y antagonistas mixtos de los receptores ETR_A y ETR_B ^{123,124}. Generalmente, se acepta que, en aquellas enfermedades en las cuales aumenta la producción de ET-1, la activación excesiva de los receptores ETR_A es peligrosa, de forma que su bloqueo farmacológico puede ser una buena estrategia terapéutica. Sin embargo, aquellos estudios realizados con antagonistas de ETR_B , sugieren que, quizás, el antagonismo de los receptores ETR_B no sea la mejor estrategia para tratar estas enfermedades.

Con respecto a la isquemia y más concretamente al desarrollo del edema, existen varios trabajos donde se afirma que el uso de antagonistas de ET-1 reduce el desarrollo del edema y el daño cerebral.

Uno de los primeros trabajos apoyando esta idea afirma que en ratas SHR sometidas a un modelo de isquemia focal permanente de 4 y 24 horas, la administración previa de Ro 61-1770 (Clazosentan, antagonista específico del receptor ETR_A) reduce el daño cerebral¹²⁵. Otro trabajo que sigue esta hipótesis es el publicado por Gupta et al¹²⁶, donde se administra el tratamiento antes de la isquemia. El TAK-044, antagonista mixto, es capaz de inhibir el efecto vasoconstrictor de la ET-1, impide el deterioro motor y revierte significativamente los cambios en los marcadores de estrés oxidativo.

Por tanto, parece ser que el momento de administración de los antagonistas resulta vital para el desarrollo del efecto neuroprotector. Sin embargo existen trabajos en los cuales se utilizan modelos diversos de isquemia (focal transitoria¹²⁷, focal permanente¹²⁸), que demuestran el efecto neuroprotector por varios mecanismos como la reducción de

edema, además de tener un efecto antiinflamatorio, aún después de haber administrado el antagonista posteriormente a la isquemia experimental.

En cambio la administración de los receptores ETR_b parece tener el efecto totalmente contrario, de forma que exacerba el daño provocado por la patología^{129,130}.

Por otro lado, estudios previos de nuestro grupo demuestran que en pacientes con ictus isquémico, tratados con tPA, los niveles de ET-1 se encuentran elevados y que estos niveles se relacionan con el desarrollo de edema cerebral grave, de forma que podemos considerar la ET-1 como un predictor del desarrollo del edema cerebral grave¹³¹.

La conclusión que podemos extraer de todos estos trabajos, es que el sistema de la ET-1 está relacionado de alguna u otra manera con los mecanismos de daño de la isquemia cerebral. Como ya hemos visto, algunas de las moléculas más fuertemente implicadas en el edema son las AQP. Puesto que la unión de la ET-1 a sus receptores provoca la activación de PKC, ésta podría estar mediando diversas modificaciones en las AQP, existiendo de esta manera un nexo entre la ET-1 y las AQP^{132,133}.

1. INTRODUCCIÓN
2. JUSTIFICACIÓN
3. HIPÓTESIS
4. OBJETIVOS
5. MATERIAL Y MÉTODOS
6. RESULTADOS
7. DISCUSIÓN
8. CONCLUSIONES
9. BIBLIOGRAFÍA

Pese a los tratamientos disponibles para reducir el edema, éste sigue siendo una de las principales causas de la alta morbi-mortalidad del ictus, debido a que los tratamientos utilizados hasta la fecha han resultado totalmente ineficaces.

A este respecto, la bibliografía previa parece demostrar una asociación entre la ET-1 y el edema cerebral en modelos animales de isquemia. Esta asociación podría estar mediada por activación de mensajeros intracelulares por parte de la ET-1 que regulan procesos de activación o inhibición de las AQPs, principales moléculas implicadas en el movimiento del agua en el edema cerebral.

Por tanto, este estudio se justifica por la necesidad de encontrar nuevas dianas terapéuticas en el tratamiento del edema en la isquemia cerebral.

1. INTRODUCCIÓN
2. JUSTIFICACIÓN
3. HIPÓTESIS
4. OBJETIVOS
5. MATERIAL Y MÉTODOS
6. RESULTADOS
7. DISCUSIÓN
8. CONCLUSIONES
9. BIBLIOGRAFÍA

Este trabajo pretende abordar el estudio de la implicación de laET-1 en los mecanismos de muerte celular neuroprotección y desarrollo de edema tras la isquemia desde diferentes enfoques, estudio *in vitro*, estudio *in vivo* y estudio clínico.

Por tanto como hipótesis de trabajo, para cada uno de los estudios, planteamos las siguientes:

Estudio *in vitro*

La administración de antagonistas de los receptores de ET-1 reduce la muerte celular en un modelo *in vitro* de barrera hematoencefálica, constituido por un cocultivo de astrocitos y células endoteliales, sometido a privación de oxígeno y glucosa.

Estudio *in vivo*

La administración de antagonistas de los receptores de ET-1 a un modelo animal de isquemia cerebral transitoria, reduce el grado de edema y el volumen de lesión, mediados por la modificación de la expresión de canales específicos de agua, las acuaporinas.

Estudio clínico

En los pacientes con ictus isquémico de menos de 12 horas de evolución, la presencia de determinados polimorfismos genéticos (SNPs) del gen de la ET-1 se asocia a una producción aumentada de ET-1 que se asocia con un mayor grado de edema, mayor volumen de infarto y peor pronóstico funcional.





1. INTRODUCCIÓN
2. JUSTIFICACIÓN
3. HIPÓTESIS
- 4. OBJETIVOS**
5. MATERIAL Y MÉTODOS
6. RESULTADOS
7. DISCUSIÓN
8. CONCLUSIONES
9. BIBLIOGRAFÍA

Objetivo principal

Estudio *in vitro*. Demostrar el efecto protector de la administración de los antagonistas de los receptores de ET-1 en un modelo *in vitro* de la barrera hematoencefálica.

Estudio *in vivo*. Demostrar que la administración de los antagonistas de los receptores de ET-1 en un modelo experimental de isquemia cerebral transitoria reduce el grado de edema.

Estudio clínico. Demostrar la asociación de la presencia de los SNPs rs5370, rs1800541, rs2071942 del gen de la ET-1, con una producción aumentada de ET-1.

Objetivos secundarios

Estudio *in vitro*

1. Demostrar el aumento de los niveles de ET-1 tras la privación de oxígeno y glucosa en un modelo *in vitro* de barrera hematoencefálica.
2. Demostrar que la administración de los antagonistas de los receptores de ET-1, induce modificaciones en la producción de las AQP.

Estudio *in vivo*

1. Demostrar que la administración de los antagonistas de los receptores de la ET-1 provoca una reducción en el volumen de infarto.

2. Demostrar que la administración de los antagonistas de los receptores de la ET-1 provoca una mejoría en la recuperación funcional, medida por el índice de lateralidad.
3. Demostrar que la administración de los antagonistas de los receptores de ET-1, induce modificaciones en la producción de las AQP.

Estudio clínico

1. Demostrar la asociación de los niveles de ET-1 con el edema cerebral.
2. Demostrar la asociación de los niveles de ET-1 con el volumen de infarto.
3. Demostrar la asociación de los niveles de ET-1 con el deterioro neurológico precoz.
4. Demostrar la asociación de los niveles de ET-1 con el mal pronóstico funcional a los 3 meses.

1. INTRODUCCIÓN
2. JUSTIFICACIÓN
3. HIPÓTESIS
4. OBJETIVOS
- 5. MATERIAL Y MÉTODOS**
6. RESULTADOS
7. DISCUSIÓN
8. CONCLUSIONES
9. BIBLIOGRAFÍA

5.1. EFECTO PROTECTOR DE LOS ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE ET-1 EN COCULTIVOS DE ASTROCITOS Y CÉLULAS ENDOTELIALES DE RATA SOMETIDOS A PRIVACIÓN DE OXÍGENO Y GLUCOSA

5.1.1. Preparación de cocultivos de células endoteliales de microvasculatura y astrocitos de rata

Para este estudio se utilizaron cultivos de células endoteliales de microvasculatura y astrocitos de cerebro de rata. Los procedimientos cumplieron con lo establecido en la legislación vigente, R.D. 1201/2005 sobre Protección de los Animales utilizados para experimentación y otros fines científicos y fueron aprobados por la Comisión de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela que ha actuado como Comité Ético de Experimentación Animal del Centro.

Se realizaron cultivos primarios de astrocitos de ratas Sprague–Dawley suministradas por el animalario de la Universidad de Santiago de Compostela. Para obtener el cultivo de astrocitos se siguió el protocolo descrito por McCarthy y cols.¹³⁴ con ligeras modificaciones. En primer lugar, se utilizaron ratas neonatas de un día de edad (P01) a las que se extrajo el cerebro y se diseccionó mecánicamente el área cortical en medio Leibovitz–15 (Gibco. Invitrogen) tras haber retirado las meninges. A continuación, el disgregado celular obtenido se incubó durante 15 minutos a 37°C con una solución de enzimas (Accutase®. Sigma), que no necesita ser inactivada posteriormente, y con el enzima DNasa (100U/mL, Sigma) para obtener una suspensión celular más homogénea, la cual se

hizo pasar por un filtro de 70µm (Filcons. Consult TS). Tras hacer el recuento de las células en la cámara de Neubauer con Azul Tripán (Invitrogen), se sembraron en *flasks* para cultivo celular T-75 (Corning) a una densidad de $6 \cdot 10^4$ células/cm², ya que se ha descrito que sembrando el disgregado celular a baja densidad se desarrollan muy pocos oligodendrocitos y el cultivo está formado casi exclusivamente por astrocitos¹³⁵. El medio de cultivo utilizado estaba compuesto de DMEM (80% v/v), glutamina (2mM), glucosa (25mM), suero bovino fetal (10% v/v), suero de caballo (10% v/v), penicilina (100U/mL) y estreptomicina (100µg/mL) (Gibco. Invitrogen). Los *flasks* se mantuvieron en un incubador a 37°C con un 97% de humedad y 5% de CO₂. Al día 3 (DIV 3), se cambió el medio por un medio de crecimiento DMEM (90% v/v), suplementado con glutamina (2mM), glucosa (25mM), suero de caballo (10% v/v), penicilina (100U/mL) y estreptomicina (100µg/mL) (Gibco. Invitrogen), y en lo sucesivo se cambió el medio cada tres días.

Las células endoteliales de microvasculatura de rata fueron obtenidas de Cell Applications (R840-05). Una vez recibidas las células fueron descongeladas y sembradas en *flasks* recubiertos de fibronectina (354521. BD), para facilitar su crecimiento. El medio de cultivo utilizado fue el medio EBM Medio Basal (CC-3121. Clonetics Lonza), suplementado con el kit de suplementos EGM SingleQuot (CC-4143. Clonetics Lonza) específico de células endoteliales de microvasculatura. El medio se cambió cada tres días.

Aproximadamente 10–15 días después, en el pase 2, los astrocitos y las endoteliales se levantaron de los *flasks* utilizando una mezcla de enzimas (Accutase®. Sigma), siendo resembradas en dispositivos *Transwell Inserts* (353090. BD) de 4.2cm² de superficie de crecimiento. En la bibliografía

previa existen abundantes referencias a tres tipos de modelos de cocultivo cuyo objetivo principal es intentar reproducir *in vitro* el comportamiento de una barrera hematoencefálica *in vivo*¹³⁶⁻¹⁴⁰ (Figura 17).

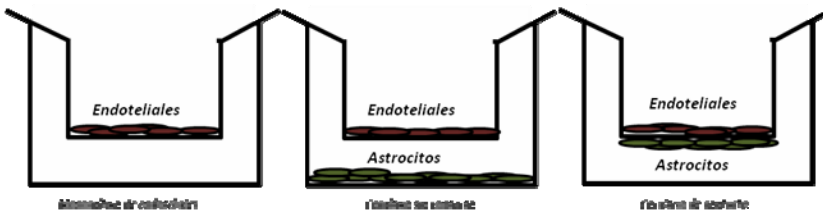


Figura 17. Modelos de cocultivo de astrocitos y células endoteliales.

Estos tres tipos de modelos presentan características diferentes. Para evaluar la idoneidad de un modelo de barrera hematoencefálica se utilizan como parámetros la expresión de proteínas de unión estrecha, como la ocludina ó ZO (Zonula Occludens), y la presencia de valores adecuados de Resistividad Transendotelial (en inglés TEER, Transendothelial Resistivity). Teniendo en cuenta lo anterior, el modelo que más se asemeja a las características fisiológicas de la barrera hematoencefálica es el de contacto entre células endoteliales y astrocitos.

Para hacer el cocultivo se siguió el protocolo publicado anteriormente, con ligeras modificaciones¹⁴¹. Brevemente, los insertos fueron recubiertos con una solución de Poly-D-Lisina (PDL) (354210. BD) a 0.51mg/mL en medio libre de suero¹⁴², en su parte inferior. Se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Al cabo de ese tiempo se retiró de la superficie inferior la solución restante y se lavó con HBSS para eliminar los posibles restos de PDL que no se hubieran unido, pues se ha demostrado que la PDL no unida puede ser inhibitoria para el crecimiento celular.

Después de esto los astrocitos se sembraron a una densidad próxima a los 80000 células/cm² (superficie de crecimiento del inserto: 4.2cm²) en la parte inferior del inserto, con medio específico de astrocitos (**Figura 18**). Se mantuvieron así durante una semana.

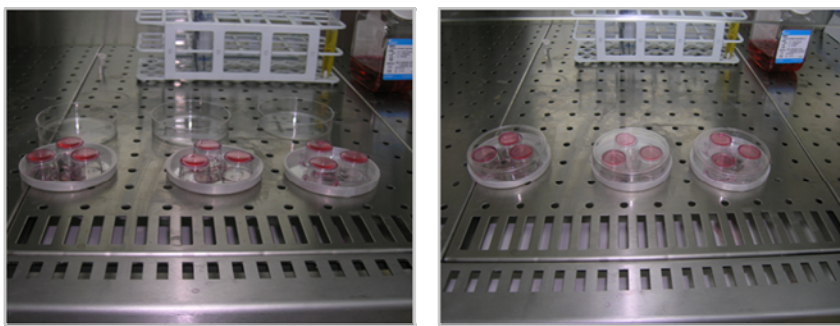


Figura 18. Cultivo de astrocitos en la parte inferior de los insertos.

Al cabo de ese tiempo los insertos se colocaron en placas de 6 pocillos (353046. BD), y fueron recubiertos en su parte interna con una solución de colágeno tipo I (354236. BD) a 50µg/mL en ácido acético 0,02N¹⁴³. Se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Al cabo de ese tiempo se sembraron las células endoteliales con una densidad aproximada de 80000 células/cm² (superficie de crecimiento del inserto: 4.2cm²).

El medio de cultivo usado en el cocultivo fue el específico de las endoteliales. Este medio se cambió cada dos días. En el tercer día de cocultivo se utilizó medio de cultivo sin FBS (suero fetal bovino), ya que se ha demostrado que la presencia en el medio de cultivo de FBS impide el desarrollo de una mayor resistividad transendotelial¹⁴⁴⁻¹⁴⁶.

Evaluación integridad del cocultivo. La integridad del cocultivo formado fue evaluada por la medida de los valores de la TEER. La presencia de las proteínas de unión estrecha, que imposibilitan el paso de sustancias al interior del parénquima cerebral, repercute en que una vez que las células endoteliales de la microvasculatura cerebrales se cultivan, formen una monocapa con unos valores de resistividad elevados, que no presentan otros tipos celulares. Por tanto, podemos usar esta característica para evaluar la integridad de la monocapa formada por las células endoteliales en el interior del inserto.

La medida de este parámetro se realiza con un voltímetro especial (Millicell®-ERS. Millipore). Este voltímetro presenta dos electrodos, de forma que el electrodo más corto se introduce en el interior del inserto y el más largo se sitúa en el exterior del inserto. El protocolo utilizado para la medida de este parámetro en la mayor parte de las publicaciones es el siguiente: en primer lugar se ha de medir la resistencia del inserto ausente de células (o inserto blanco), este valor suele rondar los 120Ω. Una vez hecho esto se mide la resistencia de un inserto donde se hayan sembrado células. Este valor menos el de la resistencia del inserto blanco nos da el valor de la resistencia originada por el cultivo celular. Para referenciar la resistencia a la unidad de superficie se utiliza la Resistividad Transendotelial (TEER), cuyas unidades son $\Omega \cdot \text{cm}^2$, siendo el producto de la resistencia del cultivo celular por la superficie de crecimiento que ofrece el dispositivo *Transwell Insert (Figura 19)*.

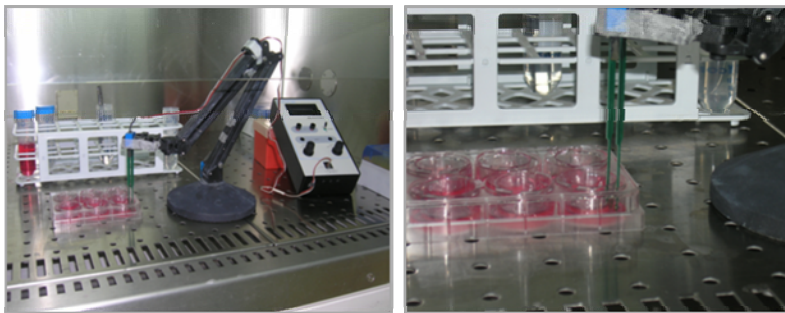


Figura 19. Proceso de medida de la TEER en los dispositivos Transwell.

En nuestro caso se utilizó un parámetro derivado de la TEER, que se definiría como el porcentaje de la variación de la TEER con respecto al inserto blanco, con el objetivo de determinar mejor los cambios producidos. Se realizaron mediciones de este parámetro a los 2, 3, 4, 5 y 6 días de cocultivo para comprobar la formación de una barrera al paso de corriente eléctrica (*Figura 20*).

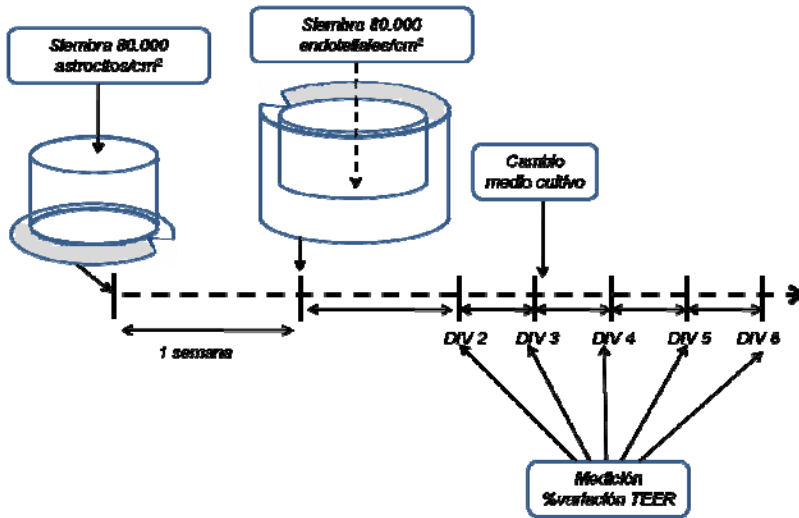


Figura 20. Puntos temporales medición de la TEER, para comprobar el perfil de crecimiento celular y la formación de barrera al paso de corriente.

5.1.2. Privación de oxígeno y glucosa (POG)

Se llevó a cabo básicamente como la describieron Goldberg y Choi¹⁴⁷. Para someter a los cultivos a isquemia según este modelo, en primer lugar se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con tampón HBSS (Invitrogen) compuesto por (mM): KCl (5.3), KH_2PO_4 (0.4), NaHCO_3 (4.2), NaCl (137.9), Na_2HPO_4 (0.3). De este modo, se consiguió eliminar más eficazmente los restos de glucosa del medio de cultivo. A continuación, se añadió la solución de isquemia, que contiene (mM): NaCl (130), KCl (5.4), CaCl_2 (1.8), MgCl_2 (0.8), NaH_2PO_4 (1.3), NaHCO_3 (26), y 2 % de suero de caballo. Estos cultivos se introdujeron en una cámara de hipoxia herméticamente cerrada (Billups-Rothenberg), termostatzada a 37°C y por la que se hace pasar una mezcla de gases que contiene 95% N_2 / 5% CO_2 a una presión constante de 0.15bar y un flujo de 2L/min durante un período de 150min (**Figura 21**). Esta mezcla de gases desplazó al oxígeno

inicialmente presente en la cámara, hecho que se comprobó introduciendo un medidor de oxígeno (OxiQuant MC. Envitec) en la cámara de hipoxia. De este modo, las células se encontraban en un medio sin glucosa y en una atmósfera sin oxígeno. Paralelamente, se utilizó un grupo que denominaremos control de isquemia, para ello, el cultivo se incubó con una solución de Krebs igual que la anterior pero a la que se añade glucosa (25mM), y se introdujo en un incubador normóxico.



Figura 21. Cámara de hipoxia termostatzada a 37°C.

Una vez finalizado el período de isquemia, tanto en el grupo control de isquemia como en el resto de los grupos de estudio, se retiró la solución de isquemia y se reemplazó por medio de reperusión sin rojo fenol, compuesto por DMEM (80% v/v), glucosa (25mM), glutamina (2mM), suero de caballo (2% v/v), penicilina (100U/mL) y estreptomicina (100µg/mL).

5.1.3. Grupos de estudio, protocolo experimental y tratamientos

Este estudio ha sido planteado de dos fases diferenciadas. El protocolo experimental que usamos para las dos fases de estudio es como sigue: al tercer día, tras sembrar los astrocitos y las células endoteliales, el medio de cocultivo utilizado fue cambiado por medio de cocultivo sin suero¹⁴⁴⁻¹⁴⁶, mantuvimos el cocultivo bajo estas condiciones durante un día más, y al cuarto día realizamos los diferentes experimentos. A partir de este momento, dependiendo de la fase de estudio el protocolo utilizado fue diferente.

1. Fase I. Los objetivos básicos de esta primera fase fueron determinar si el modelo de POG inducía muerte celular y determinar *in vitro* el pico de producción de ET-1 tras la isquemia con una *n* de 6.

A) De esta manera, para el **análisis de la muerte celular** se emplearon dos marcadores:

a) LDH. El enzima lactato deshidrogenasa (LDH) posee una localización citoplasmática, por lo que su cuantificación en el medio de cultivo (LDH liberada) es un parámetro ampliamente utilizado como indicador de la viabilidad celular relativa, así como de la integridad de la membrana plasmática¹⁴⁸. El ensayo se basa en la reducción de NAD⁺ por la acción de la LDH, transformándose en NADH que es utilizado para la conversión estequiométrica de un compuesto coloreado, cuya absorbancia se mide a 490nm de longitud de onda. Para su determinación se recogieron 125uL del medio de perfusión de cada pocillo 24 horas tras el final de la POG. Estas muestras se guardaron a -80°C hasta el momento de análisis. Para

su análisis se utilizó un kit comercial (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de la absorbancia se llevó a cabo en el lector Synergy2 (Biotek) a una longitud de onda de 490nm.

- b) Caspasa-3.** Como indicador de apoptosis, se determinó la actividad caspasa-3 en lisados celulares mediante un kit comercial (Caspase3 Assay Kit, Colorimetric, Sigma). Este kit se basa en la hidrólisis del sustrato peptídico Ac-DEVD-pNA por la caspasa-3, resultando en la liberación de la fracción de p-Nitroanilina (pNA). La p-Nitroanilina presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda de 405nm. La cantidad de la p-Nitroanilina liberada se puede relacionar con la actividad de la caspasa-3 mediante la ecuación:

$$\text{Actividad caspasa-3} = \text{umol pNA} \cdot d / t \cdot v$$

donde d es el factor de dilución, t el tiempo de reacción y v el volumen de muestra en mL. Las mediciones de absorbancia a 405nm se realizaron en el lector Synergy 2. Se obtuvieron de lisados celulares obtenidos a las 24 horas tras el final de la POG.

- B)** Por otra parte, para el **análisis de la producción endógena de ET-1**, se recogieron alícuotas de 40μL del medio de cultivo de cada pocillo a los 4 días de cocultivo, justo antes de la POG. Una vez finalizada la POG, se retiró una alícuota de 40μL de la solución de isquemia, que se consideró como la muestra a tiempo 0 (t_0). Una vez hecho esto se retiró la solución de isquemia y se reemplazó por medio de perfusión sin rojo fenol, PSG, y un 2% de suero, retirándose 40μL del medio de perfusión de cada pocillo, 1, 2, 3, 4, 5 y 24 horas tras la POG. Estas muestras fueron guardadas a -80°C hasta el momento de análisis, utilizando el kit ELISA comercializado (Biomedica Gruppe).

C) Igualmente analizamos la **evolución del porcentaje de variación de la TEER** a los 2, 3 y 4 días de iniciado el cocultivo, y justo después (t_0) y a las 24 horas (t_{24}), tras el final de la POG. Relacionado con este parámetro analizamos la producción de las proteínas de unión estrecha a partir de los lisados celulares obtenidos a los 4 días en un cocultivo y a las 24 horas tras el final de la POG en otro cocultivo realizado en paralelo (**Figura 22**).

El protocolo utilizado en el análisis de producción de las proteínas de unión estrecha es como sigue: se retiró el medio de cocultivo y se lavaron las células dos veces con HBSS previamente enfriado a 4°C. A continuación se añadió a cada pocillo 500µL de una solución de mezcla de enzimas (Accutase®, Sigma). Se dejaron incubando con esta disolución durante 15 minutos a 37°C, hasta que las células se despegasen. Una vez despegadas, éstas se agruparon en un Falcon de 15mL. Este Falcon se centrifugó a 900rpm durante 15 minutos. Después de esto se eliminó el sobrenadante y se añadió 500µL de tampón de lisis (Invitrogen) compuesto por (mM): Tris pH 7.4 (10), NaCl (100), EDTA (1), EGTA (1), NaF (1), Na₂P₄O₇ (20), Na₃VO₄ (2), Tritón x-100 1%, glicerol 10%, SDS 1% y deoxicolato 0.5%, suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche). Posteriormente la muestra se sonicó (UP100H, Hielscher), y se incubó a 99°C durante 5 minutos.

Por último las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos, y posteriormente fueron guardadas a -80°C.

El contenido de proteína total en los lisados celulares se determinó mediante el ensayo de Bradford¹⁴⁹, utilizando una recta patrón con albúmina sérica bovina (GE Healthcare) y reactivo de Bradford (BioRad). La lectura de absorbancia se realizó a 595nm en el lector Synergy 2 (Biotek) y

se ajustaron todas las muestras a la misma concentración final de proteína.

Una vez cuantificada la cantidad de proteína y preparadas las muestras en tampón de carga Laemmli (Sigma), se incubaron durante 5min a 95°C. Este tampón está compuesto por Tris HCl 0.125 M, SDS 4%, glicerol 10%, 2-β-mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0.004%, pH 7. A continuación, las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) a una concentración del 7,5%. Se cargaron 40μg de proteína por calle y la electroforesis se realizó a un voltaje constante de 95V. Una vez realizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF específica para fluorescencia (Immobilon-FL, Millipore) previamente activada con metanol, y se llevó a cabo una transferencia semiseca (SemiDry Transfer Cell, BioRad) durante 45min a 15V. Posteriormente, las membranas se incubaron en tampón de bloqueo (5 % leche desnatada en TBS) en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras el bloqueo, las membranas fueron incubadas con diferentes anticuerpos primarios.

En el caso de la ZO-1, las membranas fueron incubadas simultáneamente con el anticuerpo primario policlonal anti ZO-1 obtenido en conejo (1:250, Invitrogen) y el anticuerpo primario monoclonal anti β-actina obtenido en ratón (1:3000, Sigma). Ambos anticuerpos se diluyeron en TBS y las membranas se incubaron en agitación suave a 4°C durante toda la noche.

En el caso de la Ocludina, las membranas fueron incubadas simultáneamente con el anticuerpo primario monoclonal anti Occludin obtenido en ratón (1:500, Invitrogen) y el anticuerpo primario monoclonal anti β-actina obtenido en conejo (1:3000, Sigma). Ambos anticuerpos se

diluyeron en TBS y las membranas se incubaron en agitación suave a 4°C durante toda la noche.

Pasado ese tiempo, e independientemente de los anticuerpos primarios con los que fueron incubados, se lavaron con tampón de lavado (TBS, Tween20 0.1%) haciendo tres lavados de 5 min cada uno. Seguidamente se incubaron simultáneamente con los dos anticuerpos secundarios correspondientes: anti conejo obtenido en cabra conjugado con el fluorocromo Cy5 y anti ratón obtenido en cabra conjugado con Cy3, ambos diluidos en tampón TBS (1:3000 cada uno, GE Healthcare). La incubación fue de 1 hora en agitación suave y oscuridad. Finalizado este tiempo, se lavaron las membranas del modo explicado anteriormente y a continuación fueron escaneadas (FX ProPlus, BioRad) a las longitudes de onda específicas para ambos fluoróforos (Cy5 ex/em 650/670nm y Cy3 ex/em 550/570nm). Las bandas fueron densitometradas y analizadas con el programa Quantity One (BioRad).

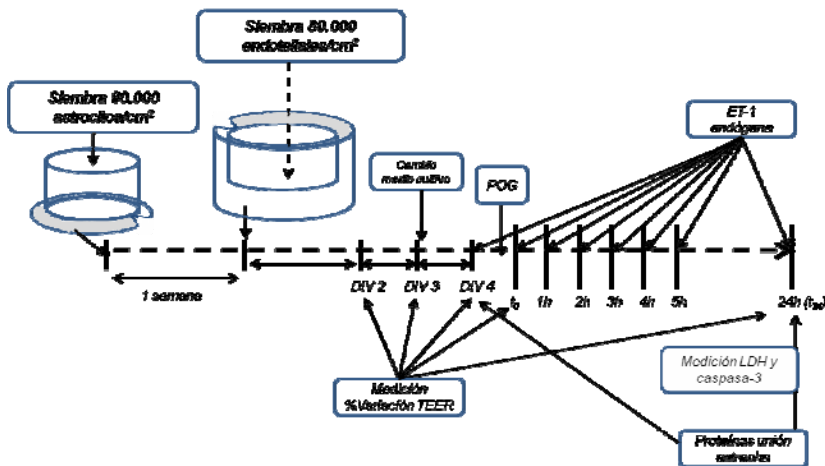


Figura 22. Puntos temporales de toma de muestra para las diferentes variables medidas en la Fase I.

2. Fase II. En esta segunda fase pretendimos evaluar el efecto protector de los antagonistas de los receptores de la ET-1 sobre los cocultivos sometidos al modelo de POG, siendo estos antagonistas el Clazosentán (Actelion), antagonista específico del receptor A, y el BQ-788 (Sigma), antagonista específico del receptor B.

El protocolo en esta segunda fase fue como sigue: tras realizar la isquemia *in vitro*, se retiró la solución de isquemia y se reemplazó por medio de reperusión sin rojo fenol, PSG, y un 2% de suero.

Los antagonistas se añadieron una hora después de la POG diluyéndolos en medio de reperusión a las concentraciones indicadas en la Tabla 1, a fin de poder establecer una relación concentración de antagonista-efecto sobre el cocultivo¹⁵⁰⁻¹⁵². Cada tratamiento fue aplicado sobre un total de 6 pocillos (*Figura 23*).

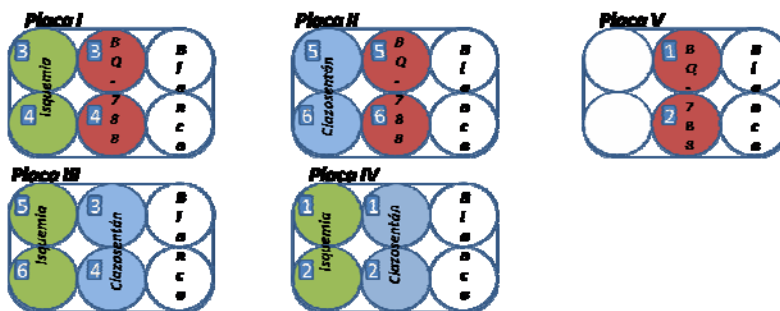


Figura 23. Ilustración de la distribución de los grupos de tratamiento de la segunda fase. Se utilizó la misma plantilla para cada concentración de estudio. No se muestra el grupo de combinación.

La distribución de los grupos de estudio en esta segunda fase se refleja en la Tabla 14.

Grupo de estudio		Tratamiento
POG		POG sin adición antagonistas
POG	Clazosentán 1nM	POG con Clazosentán 1nM
	Clazosentán 500nM	POG con Clazosentán 500nM
	Clazosentán 1μM	POG con Clazosentán 1μM
POG	BQ-788 1μM	POG con BQ-788 1μM
	BQ-788 10μM	POG con BQ-788 10μM
	BQ-788 100μM	POG con BQ-788 100μM;
POG+Clazosentán+BQ-788		Combinación de los tratamientos más eficaces en la protección

Tabla 14. Grupos de tratamientos en la segunda fase del estudio in vitro. Los grupos de combinación de diferentes antagonistas se realizaron con las concentraciones que resultaron más eficaces en la prevención de la muerte celular.

Para evaluar el efecto de la POG o de los antagonistas sobre la muerte celular se utilizaron dos marcadores de muerte celular, la LDH y la caspasa-3, previamente descritos.

Evaluamos igualmente la evolución del porcentaje de variación de la TEER a los 2, 3 y 4 días de iniciado el cocultivo, y justo después (t_0), a las 10 horas (t_{10}) y a las 24 horas (t_{24}), tras el final de la POG. También evaluamos la producción de AQPs a las 24 horas tras el final de la POG, según queda reflejado en la Figura 24.

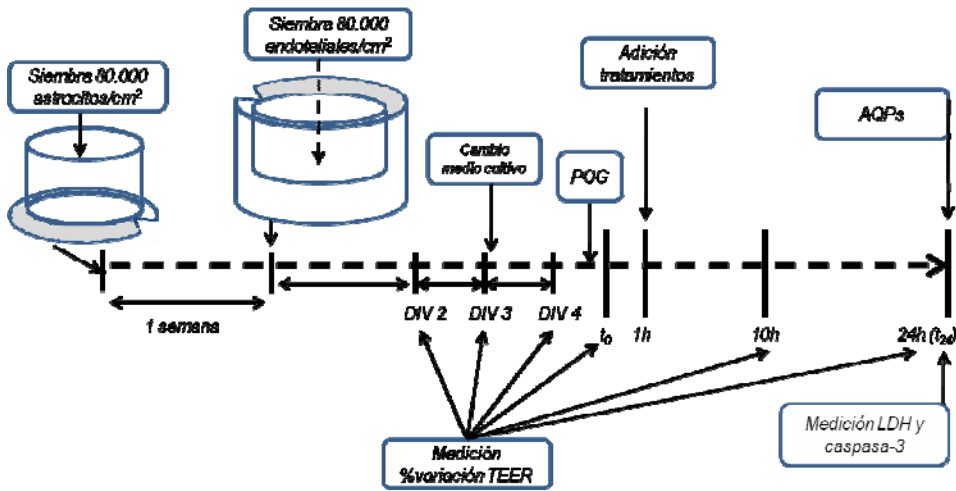


Figura 24. Puntos temporales de toma de muestra para las diferentes variables medidas en la Fase II.

Para analizar la influencia de los diferentes tratamientos sobre la producción de AQP's, se recogieron los lisados celulares a las 24 horas tras el final de la POG. El protocolo utilizado para lisar las células es el mismo que el ya descrito en el caso de las proteínas de unión estrecha. Los lisados celulares provenían de los grupos que habían sido tratados con las concentraciones de antagonistas más eficaces en la reducción de la muerte celular.

A continuación, las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a una concentración del 10%. Se cargaron 20µg de proteína por calle y la electroforesis se realizó a un voltaje constante de 95V. Una vez realizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF específica para fluorescencia (Immobilon-FL. Millipore) previamente activada con metanol, y se llevó a cabo una transferencia semiseca (SemiDry Transfer

Cell. BioRad) durante 45min a 15V. Posteriormente, las membranas se incubaron en tampón de bloqueo (5% leche desnatada en TBS) en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras el bloqueo, las membranas fueron incubadas con diferentes anticuerpos primarios

En el caso de la AQP4, las membranas fueron incubadas simultáneamente con el anticuerpo primario policlonal anti AQP4 obtenido en conejo (1:1000. Abcam) y el anticuerpo primario monoclonal anti β -actina obtenido en ratón (1:3000. Sigma). Ambos anticuerpos se diluyeron en TBS y las membranas se incubaron en agitación suave a 4°C durante toda la noche.

En el caso de la AQP9, las membranas fueron incubadas simultáneamente con el anticuerpo primario monoclonal anti AQP9 obtenido en conejo (1:1000. Abcam) y el anticuerpo primario monoclonal anti β -actina obtenido en ratón (1:3000. Sigma). Ambos anticuerpos se diluyeron en TBS y las membranas se incubaron en agitación suave a 4°C durante toda la noche.

Pasado ese tiempo, e independientemente de los anticuerpos primarios con los que fueron incubados, se lavaron con tampón de lavado (TBST, Tween20 0.1%) haciendo tres lavados de 5min cada uno. Seguidamente se incubaron simultáneamente con los dos anticuerpos secundarios correspondientes: anti conejo obtenido en cabra conjugado con el fluorocromo Cy5 y anti ratón obtenido en cabra conjugado con Cy3, ambos diluidos en tampón TBS (1:3000 cada uno. GE Healthcare). La incubación fue de 1 hora en agitación suave y oscuridad. Finalizado este tiempo, se lavaron las membranas del modo explicado anteriormente y a continuación fueron escaneadas (FX ProPlus. BioRad) a las longitudes de onda específicas para ambos fluoróforos (Cy5 ex/em 650/670nm y Cy3

ex/em 550/570nm). Las bandas fueron densitometradas y analizadas con el programa Quantity One (BioRad).

5.2. EFECTO NEUROPROTECTOR DE LOS ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE ET-1 EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA

5.2.1. Animales de experimentación

La especie utilizada fue la rata y la cepa Wistar. Los animales fueron proporcionados por la empresa Harlam. El peso de las ratas varió entre los 350 ± 25 gramos en el momento de la cirugía.

Los animales permanecieron estabulados en el Laboratorio de Investigación de Neurociencias Clínicas del Hospital Clínico Universitario

de Santiago de Compostela. Se mantuvieron en ciclos de día/noche de 12h (6:00-18:00h ciclo de luz/18:00-6:00h ciclo de oscuridad), a una temperatura de $22\pm1^{\circ}\text{C}$ y una humedad del $60\%\pm5$ durante un período de una semana previo a la cirugía y hasta un máximo de 14 días después de la cirugía. Las ratas fueron alimentadas con bebida y comida *ad libitum*. Como alimento se les suministró *pellets* de pienso de mantenimiento (Scientific Animals Food & Engineering, SAFE, France).

En la Tabla 2, se ven representados los valores de distintos parámetros fisiológicos recogidos en los animales previos a la oclusión de la arteria cerebral media. Las muestras se tomaron en la vena de la cola de las ratas. Las muestras se recogieron en capilares para gasometría y se analizaron con un analizador automático iSTAT (Abbot Inc.). Todos estos valores estaban dentro del rango normal para esta especie animal.

<i>pH</i>	7.37 ± 0.03	<i>Na⁺</i>	$134.43\pm1.40(\text{mM})$
<i>pCO₂</i>	$56.26\pm4.87(\text{mmHg})$	<i>K⁺</i>	$4.39\pm0.39(\text{mM})$
<i>pO₂</i>	$54.71\pm15.72(\text{mmHg})$	<i>Ca²⁺</i>	$1.18\pm0.17(\text{mM})$
<i>BE</i>	$6.71\pm1.89(\text{mM})$	<i>Glu</i>	$137.86\pm24.60(\text{mg/dL})$
<i>HCO₃⁻</i>	$32.10\pm1.68(\text{mM})$	<i>Hct</i>	$40.57\pm2.30(\%\text{PCV})$
<i>tCO₂</i>	$33.71\pm1.70(\text{mM})$	<i>Hb</i>	$13.80\pm0.80(\text{g/dL})$
<i>sO₂</i>	83.43 ± 7.00		

Tabla 2. Parámetros fisiológicos en la rata.

5.2.2. Oclusión intraluminal transitoria de la ACM

Este procedimiento quirúrgico está basado en el protocolo descrito por Longa¹⁵³ con modificaciones. Dichos procedimientos quirúrgicos fueron

realizados usando un microscopio quirúrgico (Leica MZ6. Leica Microsystems).

Para la inducción de la anestesia se utilizó Sevoflurano (Sevorane. Abbot) al 8% en una mezcla gaseosa de $O_2:N_2O$ (30:70), manteniendo además la temperatura corporal a 37°C mediante la utilización de una manta homeotérmica conectada a una sonda rectal PT100. Durante el proceso quirúrgico los animales permanecieron anestesiados con Sevoflurano al 4% siendo administrado al animal en una mezcla gaseosa de $O_2:N_2O$ (30:70) mediante una máscara facial asegurada al morro del mismo.

A) Preparación del filamento. Se usó una pistola de cola termofundible y se dejó caer una gota de pegamento fundido sobre la mesa e inmediatamente se introdujo un monofilamento de nailon 4/0 que al retirar se giró sobre sí mismo, para que al enfriar el pegamento se generase una bola en la punta del filamento. El tamaño de la punta que se formó depende de la profundidad y velocidad de inmersión del filamento en la gota de pegamento fundido, de la velocidad de retirada del mismo y del movimiento rotatorio del filamento mientras endurecía la cola termofundible. Se capturó digitalmente una imagen de cada filamento y se midieron las dimensiones de la esfera que se formó en su extremo mediante el software imageJ (NIH, Bethesda, MD). Se desecharon los filamentos cuyas dimensiones fuesen diferentes a $325\pm 20\mu m$ de ancho y $575\pm 25\mu m$ de largo.

B) Situación de la sonda laser-doppler. En primer lugar, tras colocar al animal en decúbito lateral derecho, se realizó una incisión desde la comisura del ojo, hasta la oreja, exponiendo el músculo temporal. Tras

realizar una pequeña incisión de unos 3 mm en el mismo, revelando el hueso temporal subyacente, se adelgazó usando una fresa y un torno microquirúrgico para facilitar la lectura de la sonda acoplada a un medidor de flujo laser-doppler (Periflux 5000. Perimed), que midió el flujo sanguíneo cerebral de la corteza cerebral situada bajo el hueso.

C) Oclusión de la ACM. Tras situar al animal en posición supina, se realizó una incisión ventral, a lo largo de la línea media del cuerpo, de unos 2 cm de longitud por encima del esternón (*Figura 25a*). Se aislaron y retiraron el músculo esternocleidomastoideo y omohioideo, exponiendo la arteria carótida común derecha (ACCD) (*Figura 25b*). Se ligó la arteria carótida externa 3 mm sobre la arteria tiroidea superior, también se ligaron las ramificaciones occipital y tiroidea superior. Para aislar el flujo en este sector de la arteria carótida externa se ligó el tronco común de la arteria carótida inmediatamente antes de su ramificación en arteria carótida externa (ACE) y arteria carótida interna (ACI), y se introdujo una ligadura temporal (a modo de lazo) en la ACI. Para asegurar que el filamento se dirigía directamente hacia la arteria cerebral media (ACM), se ligó también la arteria pterigopalatina. A continuación se realizó una incisión en la ACE por la cual se introdujo el monofilamento de nylon, que se aseguró a la arteria por medio de una ligadura (*Figura 25c*).

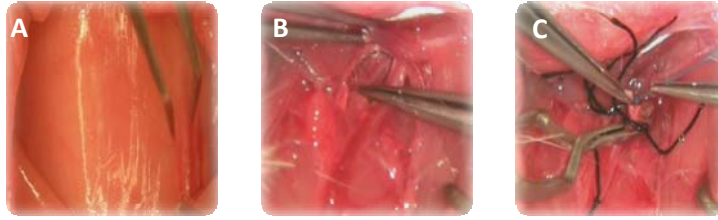


Figura 25. Incisión ventral y exposición del músculos esternocleidomastoideo (25a). Aislamiento de la arteria carótida común derecha (25b). Introducción del filamento (25c).

Tras empujar el filamento hasta que superó la arteria pterigopalatina (**Figura 26**), se colocó la sonda laser-doppler y comenzó la lectura del flujo sanguíneo cerebral durante 5min, para determinar el flujo basal. Se empujó el filamento hasta introducirlo unos 20mm hasta observar la caída del flujo sanguíneo. Tras monitorizar el flujo sanguíneo durante 60min y comprobar que no ocurren reperfusiones, se retiró el filamento y se produjo la recuperación del flujo. Una vez desinfectadas las heridas y aplicado un analgésico tópico, se retiró la anestesia y se dejó despertar al animal en su jaula manteniendo la temperatura corporal mediante una lámpara.

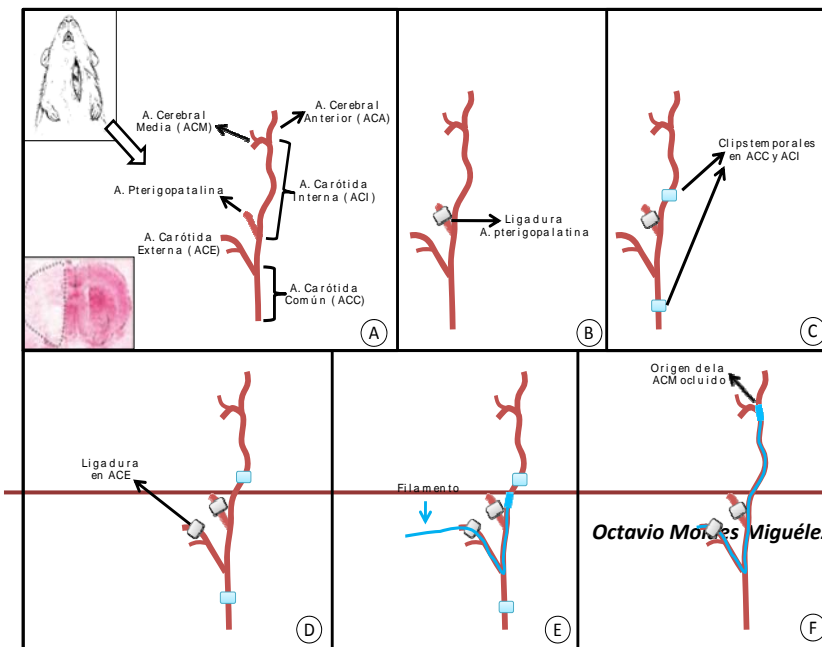


Figura 26. Esquema que representa las fases del modelo de oclusión mediante sutura intraluminal. Aislamiento de las ramificaciones de la arteria carótica (A). Ligadura permanente (B). Se establecen clips temporales en las ramificaciones ACC y ACI (C). Ligadura y sección de la ACE (D), introducción del filamento (E), oclusión de la ACM (F).

D) Criterios de exclusión. Se establecieron por Láser-Doppler los siguientes:

- 1. No observar caída de flujo sanguíneo.
- 2. Caída de flujo sanguíneo inferior al 65% del flujo sanguíneo normal.
- 3. Duración de las reperfusiones espontáneas durante la oclusión superior a 15 minutos.
- 4. Flujo sanguíneo tras la retirada del filamento inferior al flujo sanguíneo normal.

5.2.3. Grupos de estudio

Se diseñaron cuatro grupos experimentales, cada uno de ellos con una *n* de 6 individuos, siendo los tratamientos: Clazosentán (Actelion), antagonista específico del receptor A de la ET-1, BQ-788 (Sigma), antagonista específico del receptor B de la ET-1, la combinación de los anteriores y un grupo control, al que se inyectó salino.

Grupo	Tratamiento
Control	MCAO+Salino
BQ-788	MCAO+BQ-788(3mg/kg)
Clazosentán	MCAO+Clazosentán(10mg/kg)
BQ-788+Clazosentán	MCAO+Clazosentán(10mg/kg)+BQ-788(3mg/kg)

Tabla 3. Grupos de tratamientos del estudio in vivo.

Los tratamientos se administraron 30 minutos tras la oclusión de la arteria cerebral media vía IV bolus (yugular) en las dosis arriba indicadas¹⁵²⁻¹⁵⁴.

5.2.4. Extracción y procesamiento de las muestras

A) Muestras sanguíneas. A cada grupo se le practicaron extracciones de sangre de 300μL de la vena de la cola del animal 30 minutos antes de la inducción de la isquemia (muestra basal), a las 24h, 72h y 7 días tras la operación. Las muestras sanguíneas se depositaron en microtubos especiales (Microtainer®. BD) con gel separador, obteniendo el suero tras una centrifugación de 3000rpm durante 15 minutos.

B) Extracción del cerebro. Todas las ratas fueron sacrificadas al séptimo día tras la isquemia y sus cerebros fueron procesados para el posterior análisis por Western Blot.

5.2.5. Test sensomotor

El test utilizado en este estudio fue el test del cilindro diseñado por Schallert¹⁵⁵, el cual consiste en la evaluación de la asimetría de las extremidades durante la actividad de exploración. Para ello se colocó el animal en un cilindro de base transparente de 20 cm de diámetro y situada por debajo de este, una cámara de video, con la cual se grabó el movimiento de exploración vertical con los miembros anteriores del animal durante 2-10 minutos, dependiendo del grado de movimiento y durante el ciclo de oscuridad.

Para el análisis de la grabación se empleó el software VirtualDub. Las conductas analizadas fueron: 1) número de veces que el animal toca la pared del cilindro 2) uso independiente de cada extremidad en el contacto con la pared del cilindro en cada movimiento ascendente. Tras la

obtención de estos valores se calcularon las medias de dichos valores (*Ecuación 1*) y el índice de lateralidad (*Ecuación 2*) según las ecuaciones

$$= \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Ecuación 1

$$I = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Ecuación 2

Las pruebas de lateralidad se realizaron 1 día previo a la cirugía (medida basal), y 1, 3 y 7 días después de la cirugía.

5.2.6. Estudios de resonancia magnética

A) Equipo de Resonancia Magnética. Las imágenes de RM fueron adquiridas usando un equipo de acceso horizontal de Bruker (Ettlingen, Alemania) modelo Biospec 94/20USR que trabaja a un campo magnético de 9,4 Teslas y tiene una boca de acceso de 20 cm de diámetro (*Figura 27*). Para la obtención de imágenes, este sistema cuenta con unos gradientes de campo magnético de 440mT/m y tiempo de alzado de 250ms.



Figura 27. Equipo de RM.

La transmisión de señal se lleva a cabo mediante una antena de volumen del tipo “birdcage” de 16 varillas, conectada a un generador de pulsos de radiofrecuencia (RF) de 1000W, trabajando a la frecuencia de 400 MHz, y la recepción se lleva a cabo mediante una antena de 4 elementos de superficie especialmente adaptada a la anatomía de la cabeza de rata, conectada a un amplificador señal de cuatro canales en paralelo, con una precisión de detección de 0,005 Hz de frecuencia y 0,06 grados de fase.

Para el soporte vital del animal, el sistema cuenta con un sistema de alojamiento que contiene un circuito de agua caliente para mantenimiento de la temperatura corporal y una máscara facial conectada a un sistema de anestesia gaseosa que opera con Sevofluorano transportado por una corriente de gases variable bajo demanda del operario (gases disponibles: aire medicinal, O₂, NO y CO₂).

B) Protocolo de imagen. En este trabajo las variables principales de estudio han sido:

- 1) el volumen de lesión
- 2) los tiempos de relajación transversal T2 de los tejidos
- 3) la formación de edema cerebral

Todos estos parámetros se determinan a partir de mapas paramétricos de tiempos de relajación transversal (mapas T2) calculados a partir de imágenes adquiridas con secuencias con peso T2 (técnica MSME) según se detalla más abajo. Así mismo, se obtuvieron imágenes angiográficas para la observación de la oclusión de la arteria cerebral media, en casos seleccionados.

Se usó una secuencia de adquisición multi-corte-multi-eco (MSME, del inglés multi-slice multi-eco) que se basa en la técnica de CPGM (Carr-Purcell-Meiboom-Gill)¹⁵⁶, con la que se adquirieron trenes de 16 ecos para la realización de mapas paramétricos de tiempos de relajación T2, ajustando las imágenes a una ecuación exponencial simple ($S=S_0 \exp[-TE/T_2]$). En la secuencia MSME se emplearon los siguientes parámetros: tiempo de eco, TE = 9ms (16 ecos); tiempo de repetición, TR=2500ms; matriz de la imagen 128·128 puntos ; campo de visión, FOV=19,2·19,2 mm², centrada en el cerebro y con una banda de saturación con orientación coronal de 20mm de espesor (pulso SINC7h de 1ms) para saturar (eliminar) la señal producida por los tejidos que se encuentran en la base del cerebro, cubriendo toda la parte inferior de la cabeza del animal. Se usaron pulsos de RF de excitación de 90° y de reenfoque de los ecos de 180°, tipo SINC3, de 1,5ms cada uno. Se adquirieron 14 cortes coronales consecutivos de 1mm de grosor, colocando el borde del primero adyacente a la fisura rinal del animal,

cubriendo así el cerebro por completo hasta el cerebelo, tal y como se ve en la Figura 28.

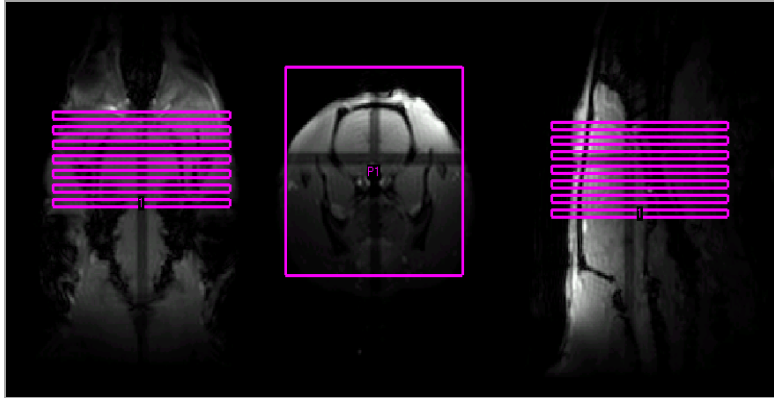


Figura 28. Imagen de la selección de los cortes antes de la adquisición de las imágenes por resonancia.

C) Análisis de datos. Todo el software necesario para el análisis completo de las imágenes ha sido desarrollado en nuestros laboratorios para los paquetes de software image-J (del NIH, Bethesda, MD, USA) e IDL (Iterative Data Language, RSI, Colorado, USA). Una vez obtenido un set de imágenes de espín-eco con 16 tiempos de eco diferentes (TE=9, 18, 27, 36, 45, 54, 63, 72, 81, 90, 99, 108, 117, 126, 135 y 144ms) se usó el mismo para hacer un ajuste pixel a pixel de las imágenes obtenidas a una ecuación mono-exponencial (**Figura 29**) de la que se obtuvieron mapas de tiempos de relajación T2 y mapas de

densidad protónica como parámetros de ajuste, tal y como se representa en la (Figura 30).

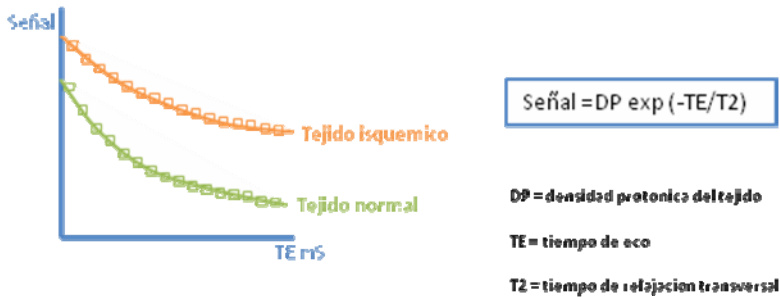


Figura 29: Análisis pixel a pixel de las imágenes adquiridas usando tiempos de eco diferente. B: En cada pixel se realiza un ajuste exponencial del que a partir de dos parámetros experimentales, el tiempo de eco (TE) y la intensidad de señal de ese pixel en la imagen (señal) se obtienen dos parámetros de ajuste que son la densidad protónica (cantidad de moléculas de agua por unidad de volumen del pixel) y el tiempo de relajación transversal T2, representativo del tipo de tejido al que pertenece el pixel analizado.

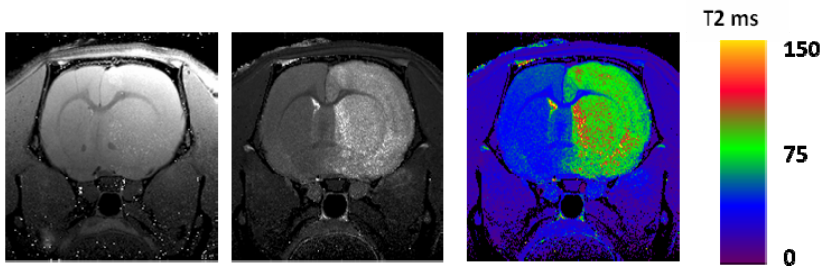


Figura 30. Mapas paramétricos de densidad protónica (izquierda) y de los tiempos de relajación T2 (centro en escala de grises y derecha en pseudo-color con su correspondiente escala) calculados a partir de las imágenes anteriores mediante ajuste exponencial pixel a pixel.

A partir de los mapas paramétricos de tiempos de relajación T2 y de densidad protónica, se calcularon las tres variables principales de este

estudio, esto es, el volumen de lesión, los tiempos de relajación T2 y la formación de edema cerebral (**Figura 31**)

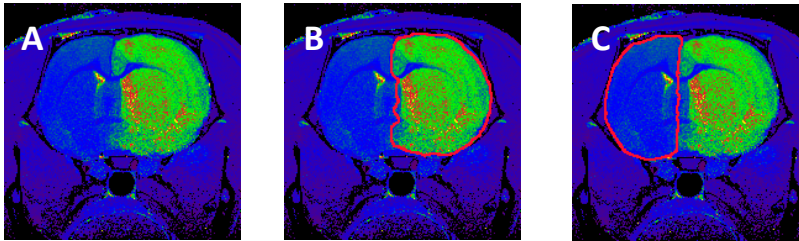
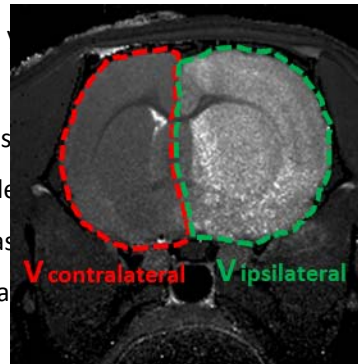


Figura 31. Método de cálculo del volumen de lesión, tiempos de relajación T2 y formación de edema cerebral. Imagen T2 de un corte coronal de cerebro (A). Selección del área de lesión por un investigador (B). Selección de una zona equivalente a la lesión en el hemisferio contralateral para el cálculo del valor medio de T2 en el tejido sano (C).

Un investigador experimentado y ciego al estudio seleccionó manualmente aquellas zonas del cerebro con tiempos T2 elevados, tal y como se observa en la Figura 31b, y zonas con tiempos T2 menores en la Figura 31c.

Siguiendo la metodología descrita, se obtuvieron mapas T2 (24 animales x 4 sesiones de imagen) en las que se midió para cada una de ellas el valor medio y la desviación estándar (en ms).



Así mismo, a partir de los mapas de relajación T2 se estudió el volumen de ambos hemisferios cerebrales por separado (mm^3) (**Figura 32**) con una doble finalidad.

En primer lugar, el volumen de hemisferio ipsilateral a la lesión isquémica se utilizó para expresar los volúmenes de lesión, no en términos absolutos (mm^3) sino relativos (% cerebral) que es otra forma

común de presentar este dato. En segundo lugar, de la relación de volúmenes hemisféricos (debe ser en torno a 1 para cerebros normales) se puede estimar el porcentaje de edema cerebral, reflejado en el desplazamiento de la línea media cerebral, según la ecuación 3:

Figura 32

$$[\%] = \left(\frac{V_{\text{lesión}}}{V_{\text{normal}}} - 1 \right) \times 100$$

Ecuación 3

Finalmente se utilizó la relación $V_{\text{sano}}/V_{\text{isquémico}}$ para corregir los volúmenes de lesión, considerando de esta manera el volumen de lesión corregido, según la ecuación 4:

$$V_{\text{lesión corregida}} = V_{\text{lesión}} \times \frac{V_{\text{sano}}}{V_{\text{isquémico}}}$$

Ecuación 4

5.2.7. Medición niveles séricos ET-1 y análisis de AQP4 y AQP9 en los grupos de estudio

A) Medición de niveles séricos de ET-1.

Para su determinación se utilizó el suero obtenido a partir de la centrifugación de las muestras sanguíneas obtenidas antes de la inducción de la isquemia (muestra basal), a las 24, 72 h y 7 días tras el final de la operación. Estas muestras fueron guardadas a -80°C hasta el

momento de análisis, utilizando el kit ELISA comercializado (Biomedica Gruppe).

B) Análisis por Western Blot de AQP4 y AQP9.

Todas las ratas fueron sacrificadas al séptimo día tras la isquemia y sus cerebros fueron procesados para el posterior análisis por Western Blot. De las ratas incluidas en el estudio se escogieron aleatoriamente dos ratas de cada grupo para hacer el análisis por Western Blot de las proteínas de interés.

El procesamiento de los cerebros se realizó en varias etapas. En primer lugar se realizó una disgregación mecánica utilizando un mortero sobre los cerebros congelados con N₂ líquido. De esta manera se obtuvo un pulverizado.

La siguiente etapa se realizó utilizando un Kit específico de extracción de proteínas (Compartmental Protein Extraction Kit, Millipore), este kit permite separar diferentes fracciones proteicas de la muestra que se esté procesando.

Una vez obtenida la fracción de interés, las muestras fueron preparadas para su separación por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) a una concentración del 10%. Se cargaron 20µg de proteína por calle y la electroforesis se realizó a un voltaje constante de 95V. Una vez realizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF específica para fluorescencia (Immobilon-FL, Millipore) previamente activada con metanol, y se llevó a cabo una transferencia semiseca (SemiDry Transfer Cell, BioRad) durante 45min a 15V. Posteriormente, las membranas se incubaron en tampón de bloqueo

(5% leche desnatada en TBS) en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras el bloqueo, las membranas fueron incubadas con diferentes anticuerpos primarios:

1. **AQP4.** En el caso de la AQP4, las membranas fueron incubadas simultáneamente con el anticuerpo primario policlonal anti AQP4 obtenido en conejo (1:1000, Abcam) y el anticuerpo primario monoclonal anti β -actina obtenido en ratón (1:3000, Sigma).
2. **AQP9.** En el caso de la AQP9, las membranas fueron incubadas simultáneamente con el anticuerpo primario monoclonal anti AQP9 obtenido en conejo (1:1000, Abcam) y el anticuerpo primario monoclonal anti β -actina obtenido en ratón (1:3000, Sigma).

Pasado ese tiempo, e independientemente de los anticuerpos primarios con los que fueron incubados, se lavaron con tampón de lavado (TBS, Tween20 0.1%) haciendo tres lavados de 5 min cada uno. Seguidamente se incubaron simultáneamente con los dos anticuerpos secundarios correspondientes: anti conejo obtenido en cabra conjugado con el fluorocromo Cy5 y anti ratón obtenido en cabra conjugado con Cy3, ambos diluidos en tampón TBS (1:3000 cada uno, GE Healthcare). La incubación fue de 1 hora en agitación suave y oscuridad. Finalizado este tiempo, se lavaron las membranas del modo explicado anteriormente y a continuación fueron escaneadas (FX ProPlus, BioRad) a las longitudes de onda específicas para ambos fluoróforos (Cy5 ex/em 650/670nm y Cy3 ex/em 550/570nm). Las bandas fueron densitometradas y analizadas con el programa Quantity One (BioRad).

5.3. ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA ET-1 CON EL GRADO DE EDEMA EN PACIENTES CON ICTUS ISQUÉMICO

5.3.1. Selección de pacientes de estudio

Para la realización del estudio de asociación se estudiaron 302 pacientes con ictus isquémico agudo de forma prospectiva. El protocolo de este estudio cumple con la legislación vigente, concretamente con lo expresado en la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica y fue aprobado por el Comité Ético del centro y se obtuvo un consentimiento informado de los pacientes o familiares. Se seleccionaron aquellos pacientes con ictus que cumplían los criterios de inclusión y no presentaban ninguno de los criterios de exclusión.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Pacientes ingresados con primer episodio de ictus isquémico hemisférico de menos de 12 horas de evolución, en los que persista la sintomatología neurológica durante al menos 2 horas.
2. Edad mayor de 18 años.
3. Ausencia de discapacidad previa (puntuación en la escala de Rankin modificada ≤ 1).

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Infarto cerebral no confirmado por tomografía computerizada.
2. Pacientes con infarto lacunar o con infartos cerebrales previos que dificulten la evaluación de los resultados.
3. Enfermedades inflamatorias, infecciosas o neoplásicas en el momento del tratamiento.

5.3.2. Evaluación clínica

Todos los pacientes fueron ingresados en una Unidad de Ictus y tratados según las recomendaciones del Grupo de Estudio de las Enfermedades Cerebrovasculares de la SEN¹⁵⁷.

En el momento del ingreso se recogió la historia clínica, incluyendo datos sobre factores de riesgo vascular, electrocardiograma de 12 derivaciones, radiografía de tórax y ultrasonografía de troncos supraaórticos, asimismo también se extrajeron muestras sanguíneas para pruebas hematológicas y de coagulación, además de para las posteriores determinaciones moleculares y el análisis del ADN.

El ictus fue clasificado según su etiología siguiendo los criterios TOAST en los siguientes subtipos: aterotrombótico, cardioembólico e indeterminado.

La gravedad del ictus fue evaluada mediante la escala NIHSS¹⁵⁸, en el momento del ingreso, a las 24±6 h, 48±6 h, 72±24 h y a los 7±1 y 90±7 días. En el caso de los pacientes tratados con tPA, se realizó una evaluación neurológica mediante dicha escala antes del tratamiento y después del mismo. Se definió la presencia de deterioro neurológico precoz (DNP) como el incremento en 4 o más puntos en la escala NIHSS durante las primeras 48 horas.

Para evaluar la situación funcional previa y a los 3 meses de los pacientes se utilizó la escala de Rankin modificada (mRS), considerando una puntuación <3 como buen pronóstico y una puntuación ≥3 como mal pronóstico (*Figura 33*).

Escala de Rankin modificada (mRS)	
0	Asintomático
1	Incapacidad no significativa pese a la existencia de síntomas; capaz de realizar su trabajo y actividad habituales.
2	Incapacidad ligera: Incapaz de realizar todas sus actividades habituales previas, capaz de realizar sus necesidades personales sin ayuda
3	Incapacidad moderada: requiere alguna ayuda, capaz de caminar sin ayuda.
4	Incapacidad moderadamente severa: incapaz de caminar sin ayuda, incapaz de atender sus necesidades sin ayuda.
5	Incapacidad severa: limitado a cama, incontinencia, requiere cuidados de enfermería y atención constante
6	Muerta

Figura 33. Escala mRS.

5.3.3. Evaluación de neuroimagen

Se realizó una TC craneal al ingreso y otra de control a las 24–36 horas y entre los días 4 y 7. El volumen del infarto fue calculado en las TC de control mediante la fórmula $0,5 \cdot a \cdot b \cdot c$, donde a y b son los diámetros

perpendiculares mayores y c es el número de secciones de 1 cm de grosor que contienen la lesión.

Asimismo, se evaluó la presencia de signos precoces de isquemia en la TC de ingreso. En la TC de control a las 24–36 horas, se valoró el volumen de hipodensidad y transformación hemorrágica (TH).

El edema cerebral se clasificó de grado I si se produce el borramiento del surco cortical, de grado II si existe asimetría ventricular, de grado III si se observa un desplazamiento de las estructuras de la línea media. El edema maligno se diagnostica si el desplazamiento de la línea media y la compresión de las cisternas basales estaba asociada con una disminución en el nivel de consciencia a la somnolencia o estupor comparado con el estado clínico basal en el momento de la admisión¹⁵⁹. Aquellos pacientes con edema cerebral clasificado como de grado III y aquellos que desarrollaron edema maligno se agruparon en la categoría de edema cerebral grave (*Figura 34*).

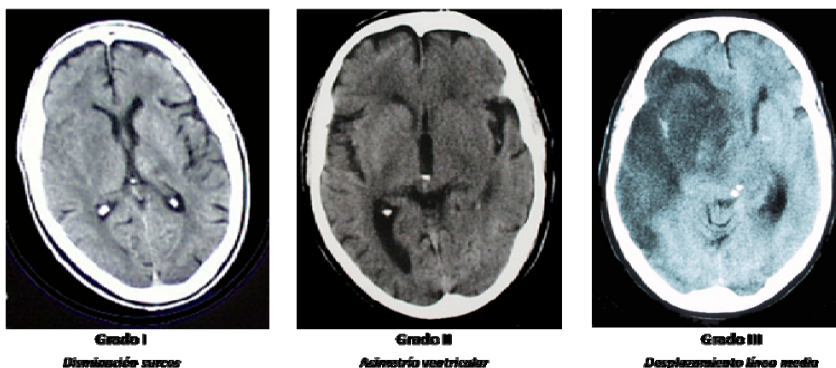


Figura 34. Grados de edema.

Igualmente se empleó la escala ASPECTS para valorar el grado de edema que presentaban los pacientes, tomando como punto de corte un valor en

la escala ASPECTS de 7, de forma que presentan valores en la escala de ASPECTS ≤ 7 desarrollaban edema grave y aquellos con valores >7 presentaban edema leve o no grave⁸⁰.

5.3.4. Evaluación pronóstica

Para evaluar el pronóstico de los pacientes, se emplearon las siguientes variables:

- 1) El volumen del infarto medido entre el 4º y el 7º día.
- 2) El deterioro neurológico precoz.
- 3) La puntuación en la mRS a los 3 meses.
- 4) La mejora en la puntuación en la NIHSS.

Se consideró deterioro neurológico precoz a un aumento igual o superior a los 4 puntos en la NIHSS en las primeras 48 horas de evolución.

Se consideró mal pronóstico cuando los pacientes presentaban una puntuación mayor de 3 puntos en la mRS o se producía el fallecimiento del paciente (asignando una puntuación de 6 en dicha escala).

La mejoría en la puntuación de la NIHSS fue determinada como la diferencia de puntuación entre el día 7 y la determinación basal, y entre el día 90 y la determinación basal.

5.3.5. Evaluación molecular

Se recogieron muestras de sangre periférica de todos los pacientes incluidos en el estudio, en el momento del ingreso, utilizando tubos de bioquímica con gel separador y tubos de hemograma con EDTA para impedir la coagulación (BD Vacutainer. BD). Los parámetros bioquímicos, así como las pruebas hematológicas y de coagulación se analizaron en el

laboratorio central del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. Por otra parte en el Laboratorio de Investigación en Neurociencias Clínicas del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, se realizaron los siguientes análisis:

A) Medición de niveles séricos de ET-1. Los tubos de bioquímica obtenidos en el momento del ingreso se centrifugaron a 3000rpm durante 15 minutos, el suero resultante se alicuoteó y se almacenó a -80°C hasta el momento de análisis, utilizando el kit ELISA comercializado (Biomedica Gruppe).

B) Análisis de polimorfismos genéticos en el gen de la ET-1. El análisis de los polimorfismos rs5370, rs1800541, rs2071942 se llevó a cabo en Mx3005p de Stratagene. Para este análisis, 1000µL de muestras de sangre periférica de tubos de hemograma con EDTA se conservaron a -80°C hasta el momento del análisis. Una vez que las muestras se descongelaron, el ADN fue extraído con el robot semiautomático MagnaPure Compact, de Roche. Se usaron 400µL de sangre total, obteniendo un volumen final de elución del ADN de 200µL. Los extractos de ADN fueron cuantificados con el sistema Nanodrop (Thermo Scientific).

Una vez normalizada la cantidad de ADN de todas las muestras, de forma que el número de copias inicial de ADN de todas las muestras es la misma, se realizó la PCR en tiempo real. Con este objetivo se utilizaron los primers y las sondas Taqman® específicas disponibles comercialmente para cada uno de los polimorfismos de interés (Eurogentec, Cultek). Las sondas Taqman® estaban marcadas con diferentes fluorocromos, FAM y HEX, dependiendo de si la sonda es

específica del alelo mutante o del alelo salvaje. Como mezcla de PCR se utilizó el kit comercializado KAPA® PROBE FAST (KAPABIOSYSTEMS).

El proceso de amplificación se llevó a cabo según el siguiente protocolo; un ciclo de 2 minutos a $T=95^{\circ}\text{C}$ y después 60 ciclos de 3 segundos a $T=95^{\circ}\text{C}$ y 30 segundos a $T=60^{\circ}\text{C}$.

Después de esto, observamos la típica curva de amplificación con la fase inicial de amplificación, la fase logarítmica lineal y la fase de meseta. En la fase exponencial, establecimos una línea umbral, usada para determinar el ciclo de la PCR en la cual empieza la amplificación para cada muestra. Este ciclo se llama Ct y se define como el ciclo a partir del cual la fluorescencia es estadísticamente significativamente por encima de la señal de ruido. Este ciclo Ct es inversamente proporcional a la cantidad inicial de ADN, de forma que cuanto más ADN menor será el Ct.

Para el análisis de los genotipos se usó el programa informático MxPro-Mx3005p de Stratagene (*Figura 35*).

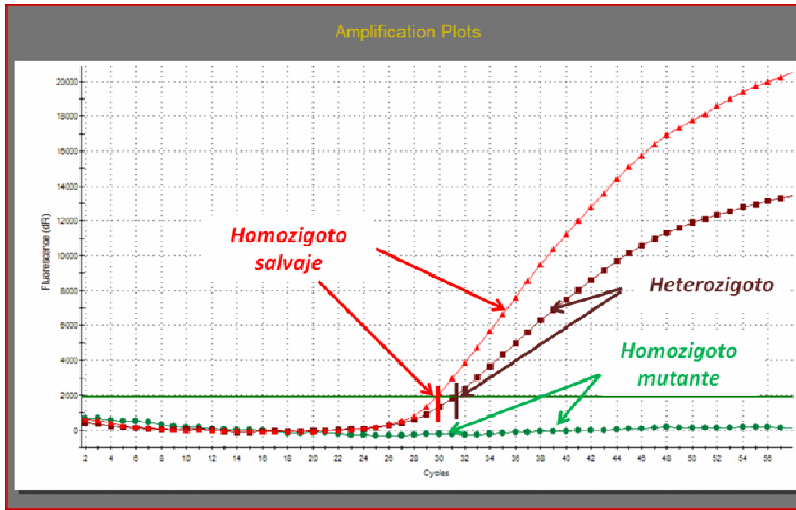


Figura 35. Imagen de PCR a tiempo real de tres genotipos distintos, haciendo referencia al diferente Ct y a las diferentes intensidades de fluorescencia al término de la reacción de polimerización.

5.3.6. Definiciones.

Ligamiento. Tendencia de genes u otras secuencias del ADN situados en *loci* específicos a ser heredados de forma conjunta como consecuencia de su proximidad física en un único cromosoma.

Desequilibrio de ligamiento. Medida de la asociación entre alelos de diferentes *loci*.

Haplotipo. Combinación de alelos ligados a múltiples *loci* que se transmiten juntos. El haplotipo se puede referir a un solo locus, a varios *loci*, o incluso a un cromosoma entero. Por otro lado, haplotipo puede hacer referencia también a un conjunto de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en una sola cromátida que se encuentran estadísticamente asociados.

Equilibrio de Hardy-Weinberg. Situación en la que una determinada población muestra frecuencias genotípicas constantes de generación en generación, y cuyas frecuencias genotípicas se pueden calcular a partir de las frecuencias alélicas por la ecuación de Hardy-Weinberg:

$$p^2+2pq+q^2=1$$

Estudio de asociación genética. Buscan establecer la relación estadística entre variables genéticas poblacionales y un fenotipo determinado (ejemplo: rasgo, riesgo de enfermedad, etc.).

5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como porcentajes para las variables categóricas y como media (desviación estándar) o mediana (cuartiles) para las variables continuas, dependiendo de si mostraron o no distribución Normal respectivamente. Para averiguar si las variables de estudio se ajustaban a una distribución Normal se realizó el test de Kolgomorov-Smirnov.

Todas las variables del estudio *in vitro* e *in vivo* se ajustaban a una distribución de probabilidad Normal, por lo que se aplicaron test estadísticos paramétricos (media±desviación estándar, test de la *t* de Student).

Estudio clínico. El test de Kolmogorov-Smirnov mostró una distribución Normal de los niveles de ET-1 séricos de los pacientes en el momento del ingreso, por lo que sus valores se expresaron como media ± desviación estándar.

Las correlaciones bivariadas se estudiaron mediante el análisis de Spearman (variables discontinuas o continuas de distribución no Normal),

de Pearson (variables continuas de distribución Normal), el test ANOVA (variables continuas en más de dos poblaciones) o el test *t* de Student (variables continuas en dos poblaciones).

La influencia de la presencia de los polimorfismos sobre la producción de la ET-1, así como la influencia de ésta sobre las diferentes variables de estudio (edema cerebral, volumen de infarto, DNP, mal pronóstico) se realizó mediante un análisis de regresión logística (variable dependiente discontinua y de naturaleza binaria) o regresión lineal múltiple (variable dependiente continua), tras ajustar por aquellas variables basales que se habían asociado significativamente con cada variable principal en el análisis univariado.

En todos los análisis se consideró que había diferencias significativas cuando $p < 0.05$. Los resultados se expresaron como OR ajustadas con intervalos de confianza del 95 % (IC 95 %). El análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS 16.0 para Windows XP.

1. INTRODUCCIÓN
2. JUSTIFICACIÓN
3. HIPÓTESIS
4. OBJETIVOS
5. MATERIAL Y MÉTODOS
6. RESULTADOS
7. DISCUSIÓN
8. CONCLUSIONES
9. BIBLIOGRAFÍA

6.1. EFECTO PROTECTOR DE LOS ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE ET-1 EN COCULTIVOS DE ASTROCITOS Y ENDOTELIALES DE RATA SOMETIDOS A PRIVACIÓN DE OXÍGENO Y GLUCOSA

6.1.1. Caracterización del modelo de cocultivo de células endoteliales y astrocitos de rata.

a) Tipos celulares empleados en el cocultivo. En la Figura 36 podemos ver imágenes de las células empleadas en el cultivo.

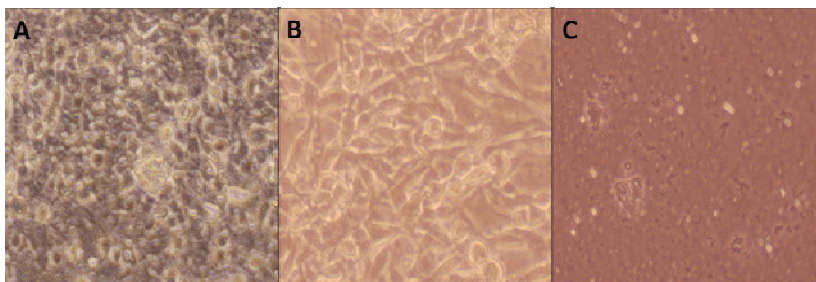
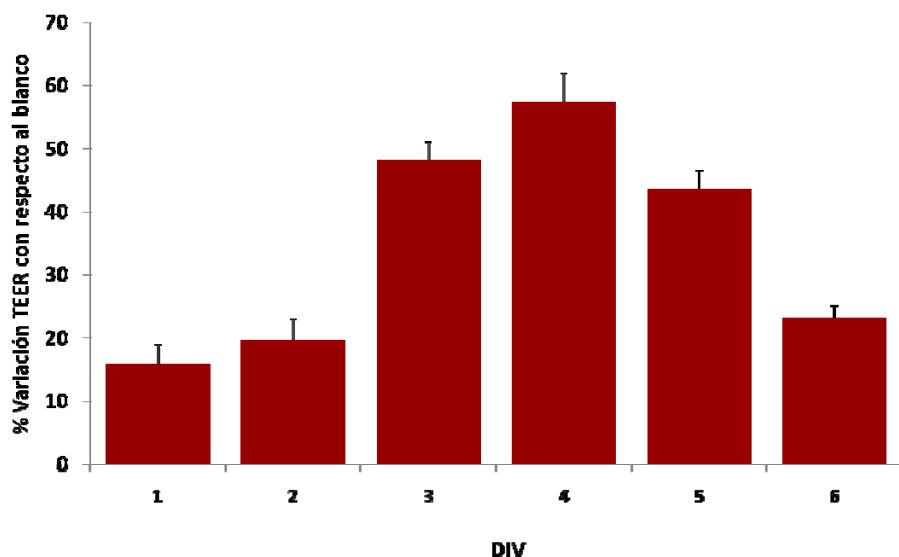


Figura 36. A: Microfotografía de astrocitos al cabo de 2 días de cultivo en la parte inferior del inserto, recubierto con una solución de lisina (0,51mg/mL). B: Microfotografía de endoteliales al cabo de 2 días de cocultivo en la parte superior del inserto, recubierto con una solución de colágeno (50 μ g/mL). C: Inserto en blanco.

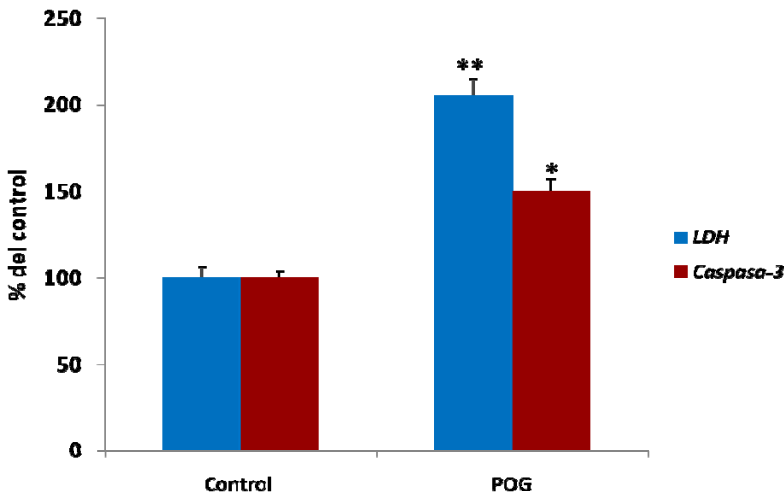
b) Evolución TEER. Como ya se ha comentado en el apartado de *Material y métodos*, el cocultivo pretende emular *in vitro* las características de la barrera hematoencefálica. Una de las características más notables de la BHE es la existencia de una alta resistencia al paso de sustancias o a la corriente eléctrica¹⁶⁰, por tanto una forma de evaluar la idoneidad del modelo de cocultivo es mediante la medida de la resistividad transendotelial (TEER). En la Gráfica 3, podemos observar la evolución de la resistividad en un cocultivo durante 6 días *in vitro*, en condiciones normales, esto es sin inducción de POG ni adición de antagonistas de ET-1 al cocultivo. Observamos que el máximo de TEER se alcanza tras 4 días de cocultivo. Tomamos ese valor límite de cocultivo para realizar los experimentos.



Gráfica 3. Evolución del porcentaje de variación de la TEER en un cocultivo durante 6 días.

6.1.2. Resultados Fase I.

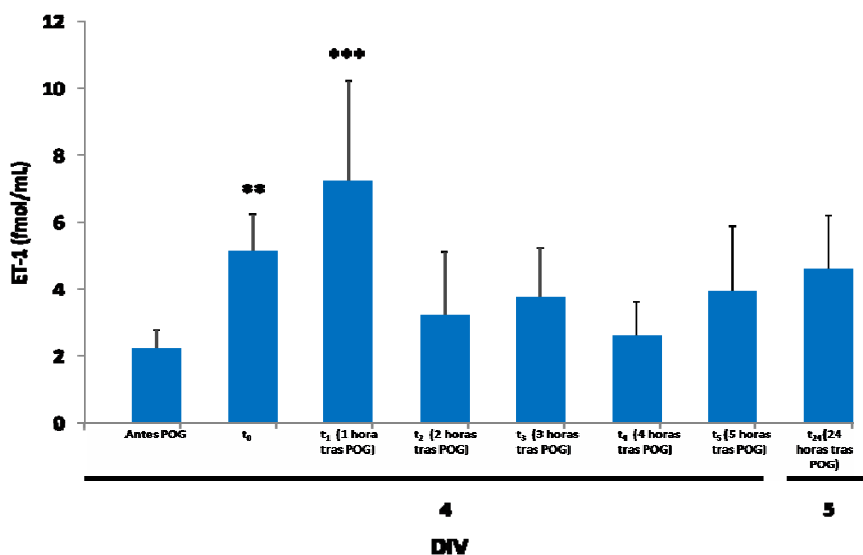
a) Efecto de la POG sobre la muerte celular. La POG indujo un aumento significativo de muerte celular, reflejado en el aumento en la liberación de la enzima LDH como de la actividad caspasa-3. Todos los parámetros de viabilidad celular fueron medidos 24 horas tras la isquemia y analizado el grupo de POG frente al de POG Control (*Gráfica 4*).



*Gráfica 4. Efecto de la POG sobre los indicadores de muerte celular: liberación de LDH y caspasa-3. ** indica $p \leq 0.01$, *** indica $p \leq 0.0001$, comparado con el grupo de control de isquemia.*

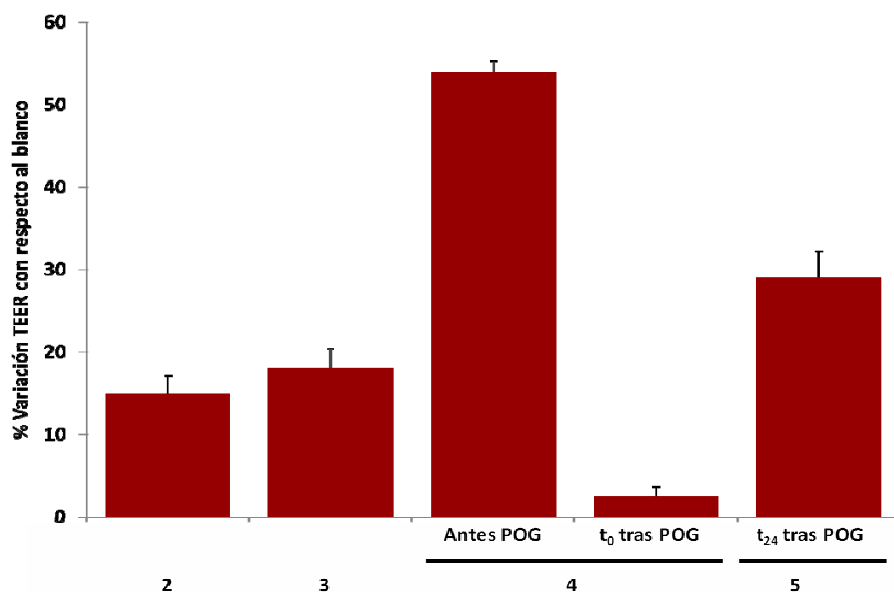
b) Perfil temporal producción ET-1 endógena tras la POG. Para saber exactamente cuándo debemos añadir los antagonistas de ET-1 tras la POG, debemos saber cuál es su perfil temporal de producción *in vitro* tras la POG. Para esto, utilizamos el grupo normal de la fase I (POG sin adición de ET-1). Como se puede observar en la Gráfica 5, el pico de

producción de ET-1 se situó en un tiempo de 1 hora tras el final de la POG. Por tanto, la adición de los antagonistas se realizó 1 hora después de la POG, previendo que sería cuando más efecto farmacológico tendrían.



Gráfica 5. Evolución de la producción de ET-1, antes y después de la POG en un cocultivo de astrocitos y endoteliales de rata. ** indica $p \leq 0.01$, * indica $p \leq 0.0001$, comparado con las muestras extraídas antes de la POG.**

c) Evolución TEER tras la POG. Observamos que, justo tras la POG, como era de esperar, la TEER bajó espectacularmente, para al cabo de 24 horas recuperar los niveles de TEER anteriores al día 4 in vitro (Gráfica 6).



Gráfica 6. Evolución del porcentaje de variación de la TEER, antes y después de la POG en un cocultivo de astrocitos y células endoteliales de rata

d) Análisis presencia de uniones estrechas. La alta resistencia que presenta *in vivo* la BHE se debe a la existencia de las proteínas de unión estrecha, por tanto otra aproximación para evaluar la integridad del cocultivo es el análisis por Western Blot de la presencia de las proteínas de unión estrecha. Para esta prueba empleamos como control positivo proteína procedente de cerebro de rata. Así, analizamos la presencia de las proteínas de unión estrecha en muestras de cocultivo obtenidas 4 días después de iniciado el cocultivo, ratificando lo observado con la medida de la TEER. Tras la inducción de la isquemia *in vitro* (POG) la expresión de las proteínas se recuperó, sugiriendo que el cocultivo se encontraba recuperado del daño isquémico 24 horas tras el final de la POG (Figura 37).

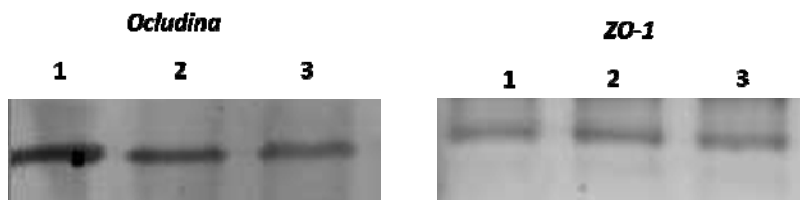
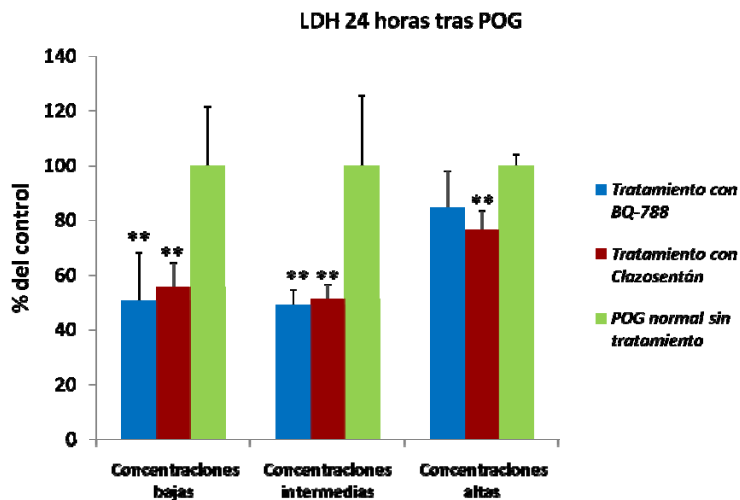


Figura 37. Imagen de las electroforesis de muestras para la presencia de las proteínas de unión estrecha: Occludina y ZO-1. Calle 1: Muestra de cerebro de rata. Calle 2: Muestra de cocultivo de 4 días de cocultivo. Calle 3: Muestra de cocultivo tras 24 horas de POG.

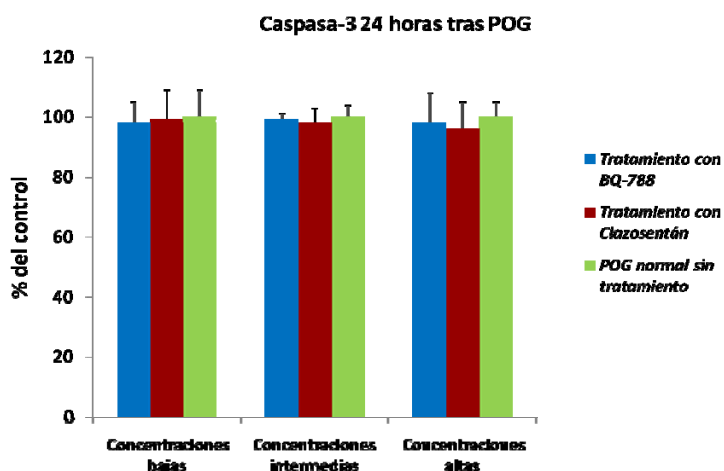
6.1.3. Resultados Fase II.

a) Efecto de los antagonistas de los receptores de la ET-1 sobre la muerte celular. Evaluamos el efecto de los antagonistas de los receptores de la ET-1 sobre la muerte celular, midiendo los niveles de LDH en el sobrenadante del cultivo y caspasa-3 procedente de los lisados celulares. Utilizamos tres concentraciones diferentes de cada antagonista. El BQ-788 indujo una reducción significativa en los niveles de LDH, al utilizar las concentraciones bajas y las concentraciones intermedias. En cambio no indujo diferencias significativas cuando se utilizó la concentración más alta. Cuando evaluamos el mismo efecto con el Clazosentán hallamos diferencias significativas en todas las concentraciones (*Gráfica 7*). Encontramos que las concentraciones intermedias de antagonistas indujeron una mayor reducción en la producción de LDH tanto para el Clazosentán como para el BQ-788.



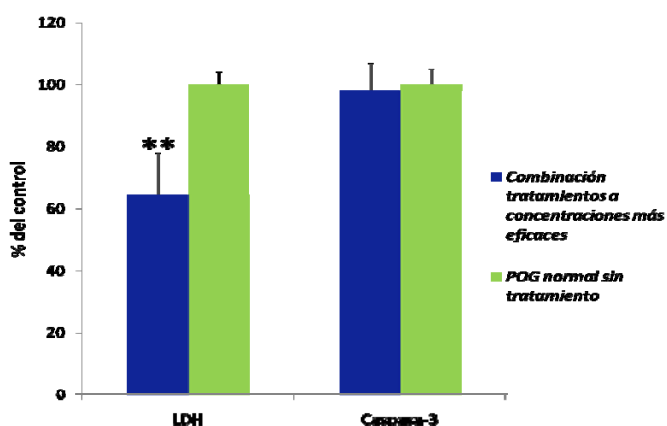
*Gráfica 7. Efecto de los tratamientos en la producción de LDH en muestras de sobrenadante de cultivo recogidas 24 horas tras el final de la POG. ** indica $p \leq 0.01$, en comparación con el grupo de POG normal sin tratamiento dentro del mismo rango de concentraciones.*

En cambio cuando evaluamos el efecto que presentaban los diferentes tratamientos en la producción de caspasa-3, no encontramos diferencias significativas entre ningún grupo (*Gráfica 8*).



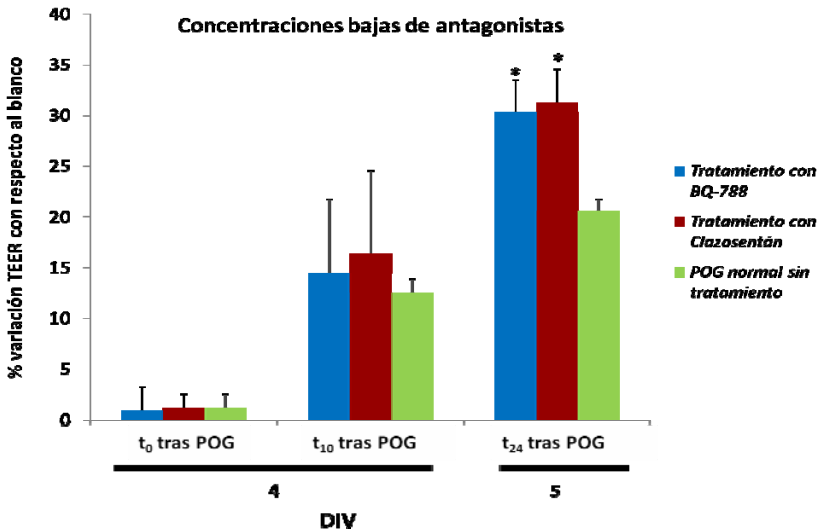
Gráfica 8. Efecto de los tratamientos en la producción de caspasa-3 en lisados celulares recogidos 24 horas tras el final de la POG.

Cuando analizamos el efecto sobre la muerte celular de la combinación de los tratamientos a las concentraciones que resultaron más eficaces, encontramos una reducción significativa en la muerte por LDH, pero de menor magnitud que la provocada por los tratamientos a concentraciones intermedias (*Gráfica 9*)

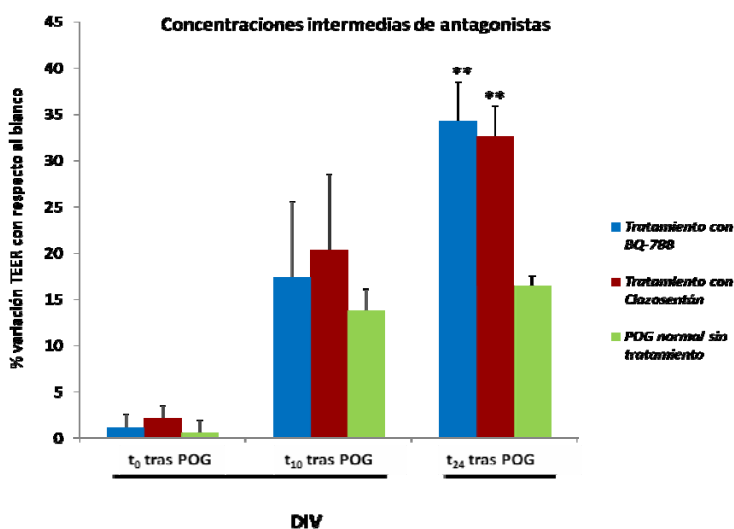


Gráfica 9. Efecto de los tratamientos en la producción de LDH y caspasa-3 obtenidos 24 horas tras el final de la POG. ** indica $p \leq 0.01$, en comparación con el grupo de POG normal sin tratamiento.

b) Relación TEER con los diferentes tratamientos. Encontramos una relación entre los diferentes tratamientos y la recuperación de la TEER a las 24 horas tras el final de la isquemia *in vitro*. De esta manera, pudimos establecer una relación directa entre la recuperación de la TEER y la reducción de la muerte por LDH en cada uno de las concentraciones de los antagonistas. Hallamos que las concentraciones más efectivas de los tratamientos reduciendo la muerte indujeron la mayor recuperación de la TEER a las 24 horas tras el final de la isquemia (**Gráficas 10 a 12**).

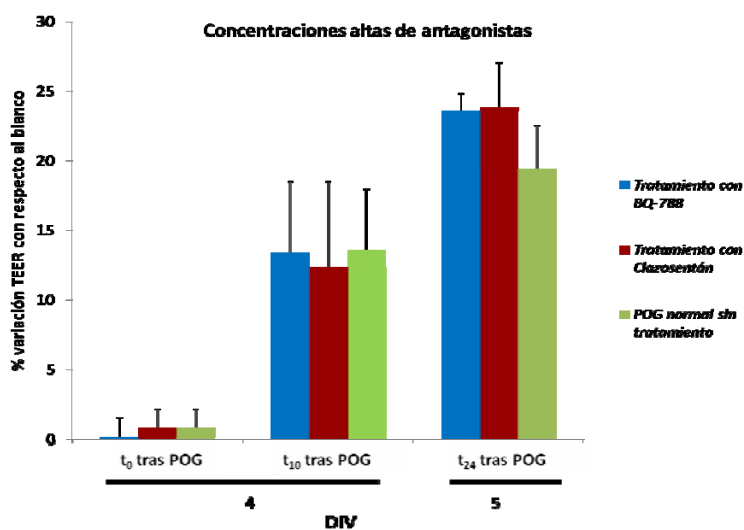


Gráfica 10. Efecto de los antagonistas a concentraciones bajas en la evolución de la TEER desde el momento 0 tras POG hasta 24 horas tras POG. * indica $p<0.05$, en comparación con el correspondiente POG normal.



Gráfico

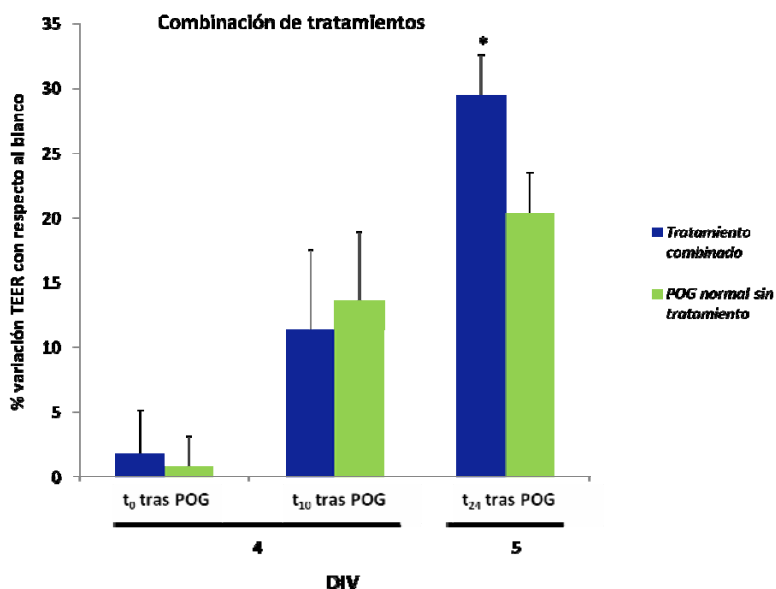
a 11. Efecto de los antagonistas a concentraciones intermedias en la evolución de la TEER desde el momento 0 tras POG hasta 24 horas tras POG. ** indica $p \leq 0.01$, en comparación con el correspondiente POG normal.



Gráf

ica 12. Efecto de los antagonistas a concentraciones intermedias en la evolución de la TEER desde el momento 0 tras POG hasta 24 horas tras POG.

Encontramos que el tratamiento combinado de los antagonistas a las concentraciones más efectivas también indujeron una recuperación significativa en la TEER a las 24 horas tras el final de la isquemia *in vitro* (Gráfica 13).



Gráfica 13. Efecto de los antagonistas a concentraciones intermedias en la evolución de la TEER desde el momento 0 tras POG hasta 24 horas tras POG.

c) Producción de AQPs.

Intentando averiguar el mecanismo por el que se producía la protección observada, realizamos Western Blot de las muestras de cocultivo sometidos a las concentraciones más eficaces, obtenidas tras 24 horas de POG.

1) Producción AQP4. Cuando evaluamos la producción de AQP4, encontramos que sólo el tratamiento con BQ-788 indujo un aumento de la producción de AQP4, aunque no llegó a ser significativo, en cambio el Clazosentán indujo una reducción significativa. El tratamiento combinado no indujo diferencias significativas (*Figura 38*).

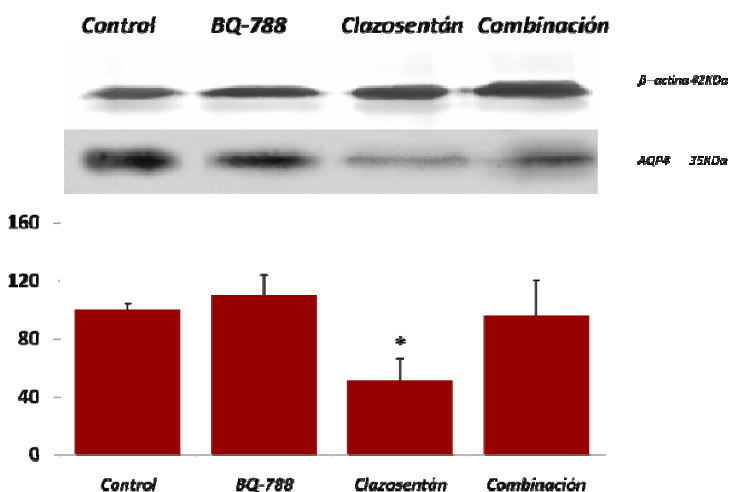


Figura 38. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la expresión de la AQP4 en muestras de cocultivo tratados con las concentraciones intermedias, obtenidas 24h tras POG. * indica $p < 0.05$, ** indica $p \leq 0.01$, *** indica $p \leq 0.0001$, comparado con el grupo control.

2) Producción AQP9. Cuando evaluamos la producción de AQP9, encontramos que el tratamiento con Clazosentán indujo una reducción en la producción de AQP9, como sucedió con la AQP4, pero no llegaba a ser significativa. En cambio el tratamiento con BQ-788 indujo un aumento significativo en la AQP9 (*Figura 39*).

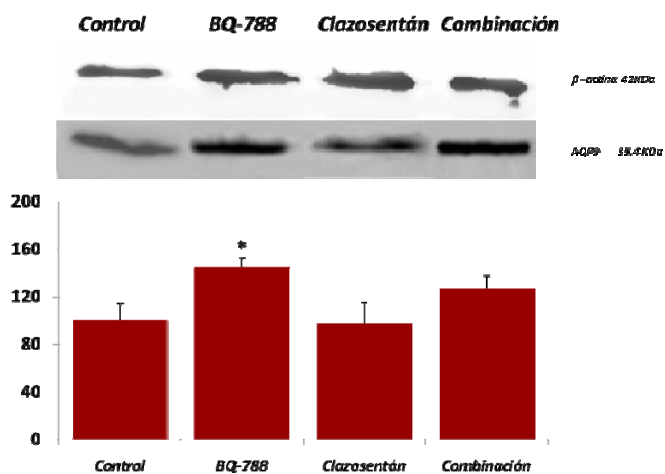


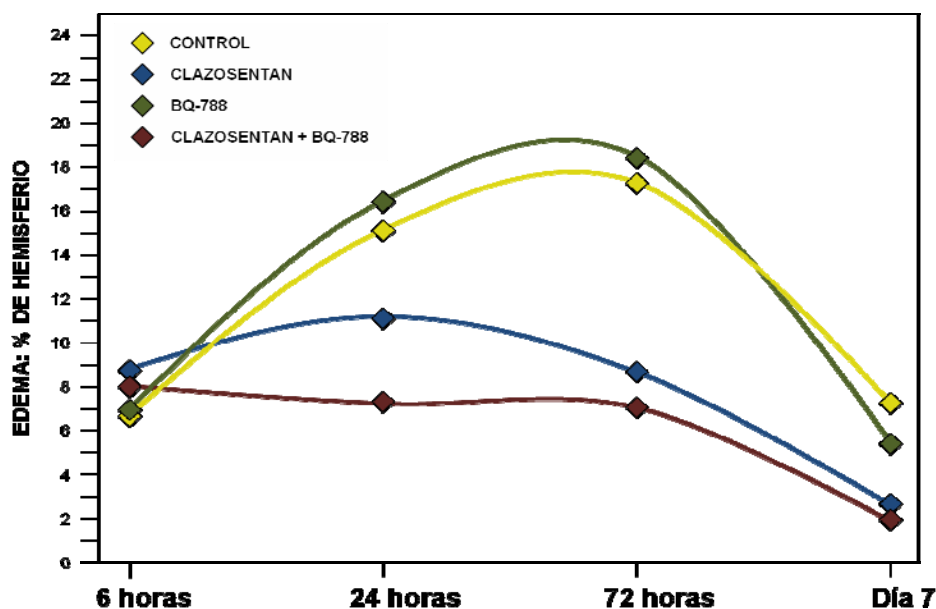
Figura 39. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la expresión de la AQP9 en muestras de cocultivo tratados con las concentraciones intermedias, obtenidas 24h tras POG.

6.2. EFECTO NEUROPROTECTOR DE LOS ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE ET-1 EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA

6.2.1. Influencia de los diferentes tratamientos sobre el edema cerebral

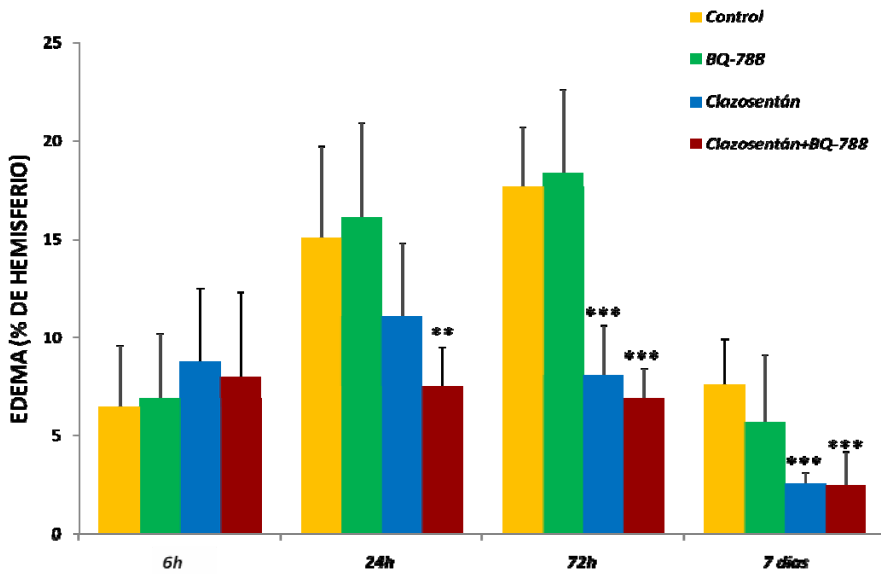
Evaluamos el efecto que poseen los antagonistas de los receptores de la ET-1 en el desarrollo de edema cerebral.

En la Gráfica 14 se representa el perfil temporal de la evolución del desarrollo del edema cerebral y cómo influyeron los diferentes tratamientos.



Gráfica 14. Perfil de evolución del edema bajo la influencia de los diferentes tratamientos, a lo largo del periodo de estudio.

De esta manera, observamos que la administración de Clazosentán redujo significativamente el edema a las 72 horas ($p<0.0001$) y a los 7 días ($p<0.0001$) tras la isquemia, en comparación con el grupo control. El tratamiento combinado (Clazosentán junto con BQ-788) redujo significativamente el edema a las 24 horas ($p=0.004$), a las 72 horas ($p<0.0001$) y a los 7 días ($p=0.001$), en comparación con el grupo control (*Gráfica 15*).

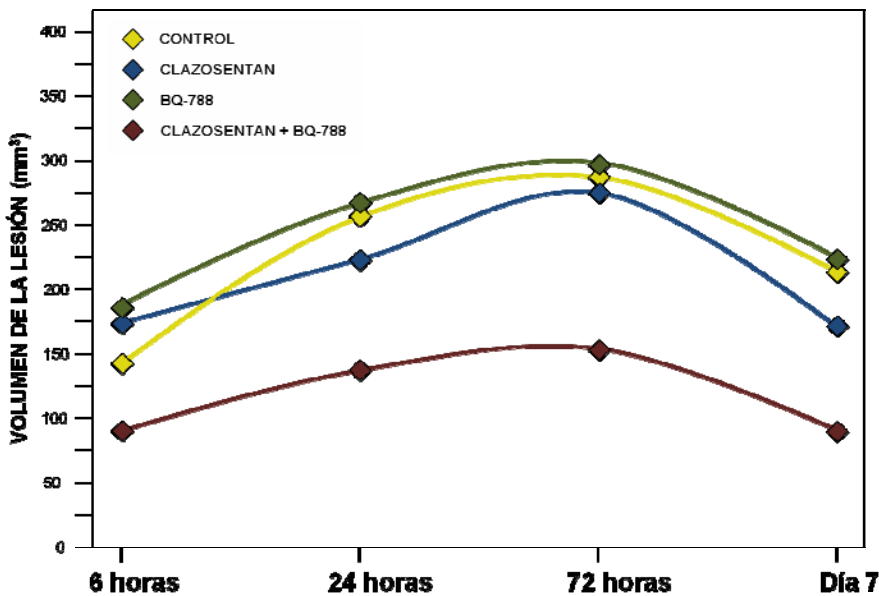


*Gráfica 15. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el edema, expresado como porcentaje de hemisferio afectado. * indica $p<0.05$, ** indica $p\leq 0.01$, *** indica $p\leq 0.0001$, comparado con el grupo control.*

6.2.2. Influencia de los diferentes tratamientos sobre el volumen de la lesión

En cuanto al volumen de lesión, lo expresamos de dos maneras diferentes: como volumen absoluto medido en mm^3 , o como volumen relativo expresado como porcentaje del volumen del hemisferio ocupado por la lesión.

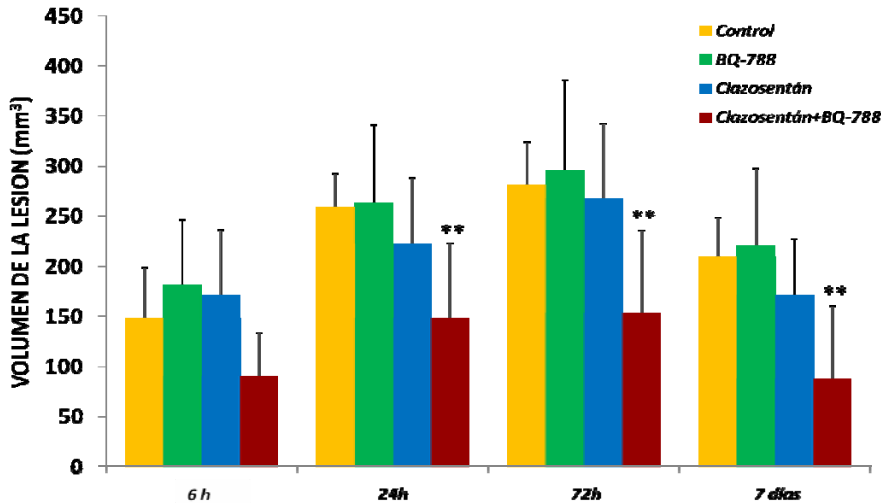
a) Volumen absoluto. La Gráfica 16 muestra la evolución del volumen de la lesión con los diferentes tratamientos.



Gráfica 16. Perfil de evolución del volumen de lesión bajo la influencia de los diferentes tratamientos, a lo largo del periodo de estudio.

Al expresar los resultados de esta manera, observamos que el tratamiento con Clazosentán y el combinado redujeron los

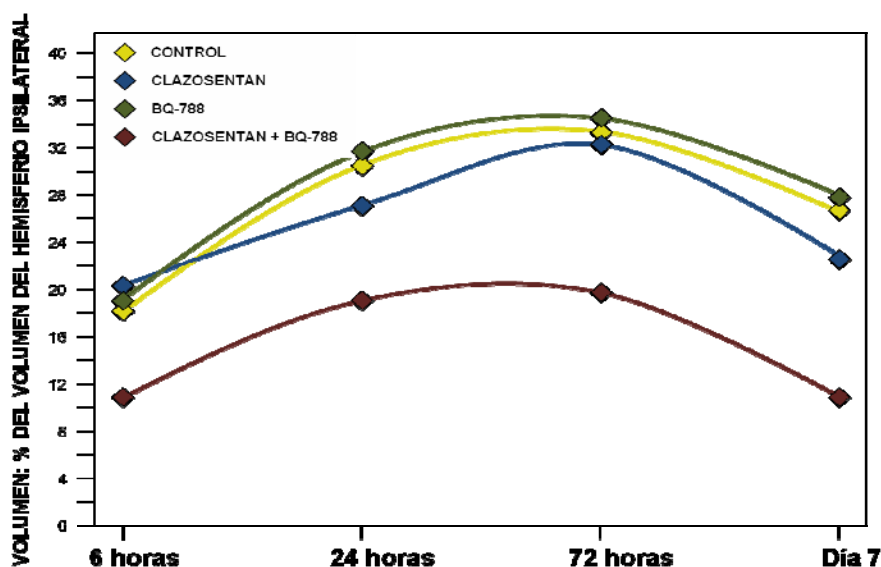
volúmenes de lesión, pero únicamente el tratamiento combinado redujo significativamente el volumen de lesión a las 24 horas ($p=0.008$), 72 horas ($p=0.007$) y 7 días ($p=0.004$), en comparación con el grupo control (**Gráfica 17**).



Gráfica 17. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el volumen de lesión. * indica $p<0.05$, ** indica $p\leq 0.01$, *** indica $p\leq 0.0001$, comparado con el grupo control.

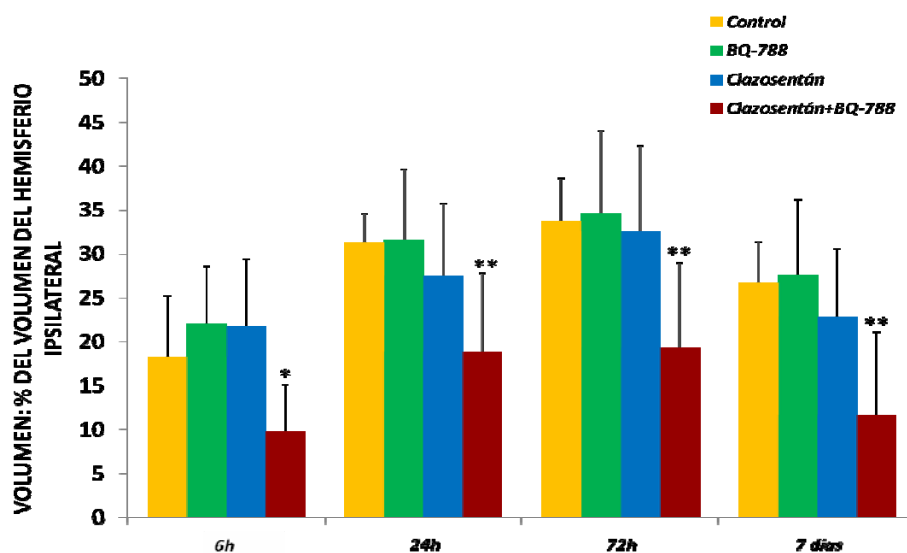
b) Porcentaje del volumen del hemisferio ocupado por la lesión.

Expresamos los resultados del volumen de la lesión como el porcentaje del volumen del hemisferio ipsilateral ocupado por la lesión. En la Gráfica 18 podemos ver el perfil de la evolución del volumen de lesión expresado como porcentaje del volumen hemisférico ocupado por la lesión.



Gráfica 18. Influencia de los diferentes tratamientos en la evolución del volumen de infarto a lo largo del periodo de estudio, expresado como % de volumen del hemisferio ipsilateral ocupado.

Al analizar esta variable observamos que el tratamiento combinado redujo significativamente el volumen de la lesión en el momento basal ($p=0.036$), a las 24 horas ($p=0.01$), a las 72 horas ($p=0.008$) y a los 7 días ($p=0.005$), en comparación con el grupo control. Sin embargo, aunque los animales tratados con Clazosentan presentaron menores porcentajes de volumen hemisférico afectado por la lesión, estas diferencias no resultaron significativas con respecto al grupo control (*Gráfica 19*).

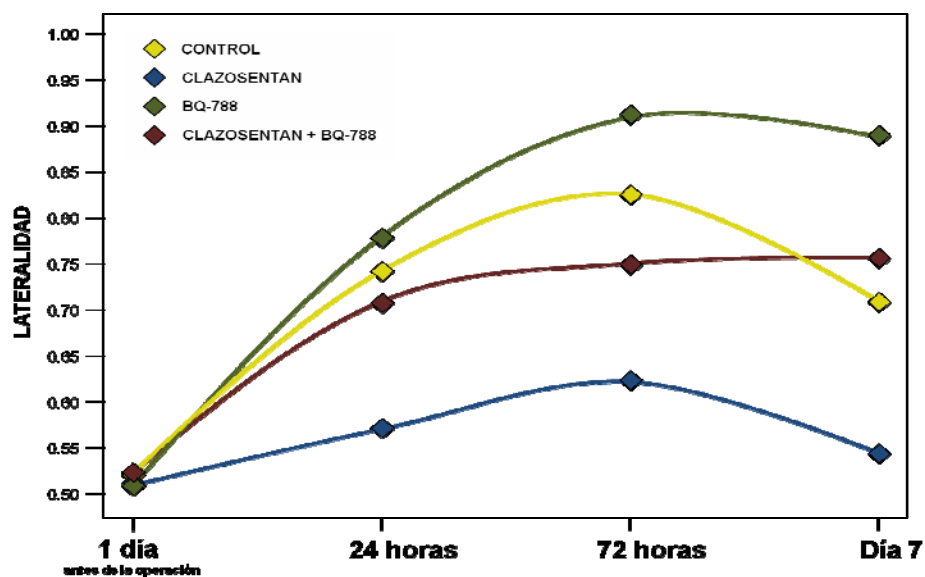


Gráfica 19. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el volumen de lesión, expresado como % de volumen de hemisferio ipsilateral ocupado. * indica $p < 0.05$, ** indica $p \leq 0.01$, *** indica $p \leq 0.0001$, comparado con el grupo control.

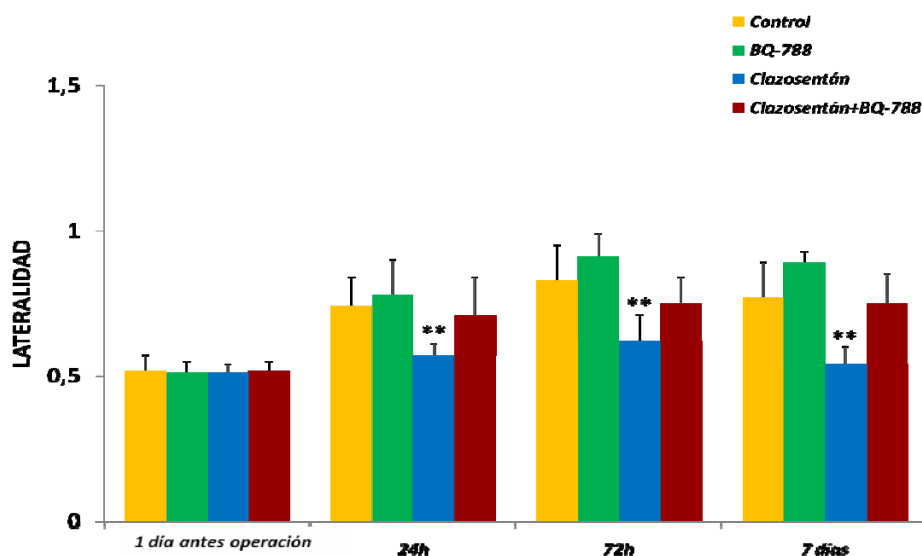
6.2.3. Influencia de los diferentes tratamientos sobre las escalas funcionales (lateralidad)

El índice de lateralidad indica la recuperación de la funcionalidad de la rata tras el episodio isquémico. En una rata sana es aproximadamente 0.5. En la Gráfica 20 vemos como en el momento basal, esto es 1 día antes de la operación, la lateralidad efectivamente ronda el valor de 0.5, para posteriormente aumentar y llegar a una fase de meseta a las 72 horas. Una vez llegado este momento decrece el índice. Al evaluar el efecto en la lateralidad de los diferentes tratamientos, observamos que únicamente el tratamiento con Clazosentán provocó una recuperación significativa de la lateralidad a las 24 horas ($p = 0.003$), a las 72 horas

($p=0.006$) y al día 7 ($p=0.002$), en comparación con el grupo control (Gráfica 21).



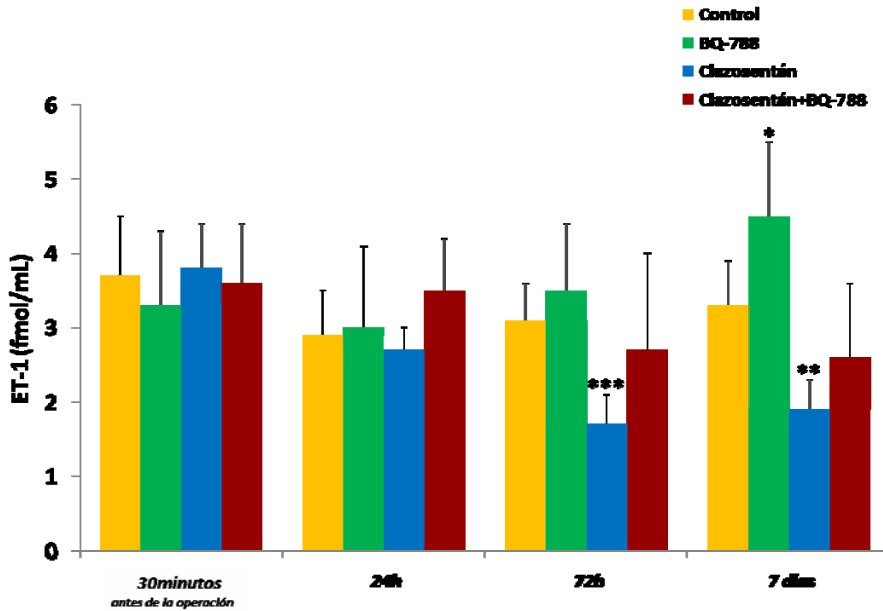
Gráfica 20. Influencia de los tratamientos en la recuperación funcional de las ratas medida por la lateralidad durante el periodo de estudio.



Gráfica 21. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la lateralidad. * indica $p < 0.05$, ** indica $p \leq 0.01$, *** indica $p \leq 0.0001$, comparado con el grupo control.

6.2.4 Niveles de ET-1 con los diferentes tratamientos

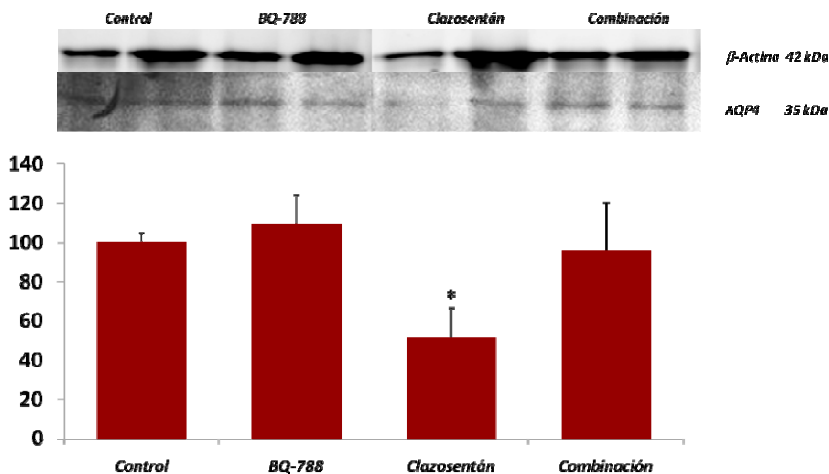
Cuando examinamos los niveles séricos de ET-1 en los puntos temporales encontramos que únicamente el tratamiento con Clazosentán redujo significativamente los niveles de ET-1 en comparación con el grupo control a las 72 horas ($p < 0.0001$) y al día 7 ($p = 0.001$). Por el contrario, el BQ-788, aumentó significativamente los niveles séricos de ET-1 al día 7 ($p = 0.026$) (Gráfica 22).



Gráfica 22. Efecto de los diferentes tratamientos en la producción de ET-1. * indica $p < 0.05$, ** indica $p < 0.01$, *** indica $p \leq 0.0001$, comparado con el grupo control.

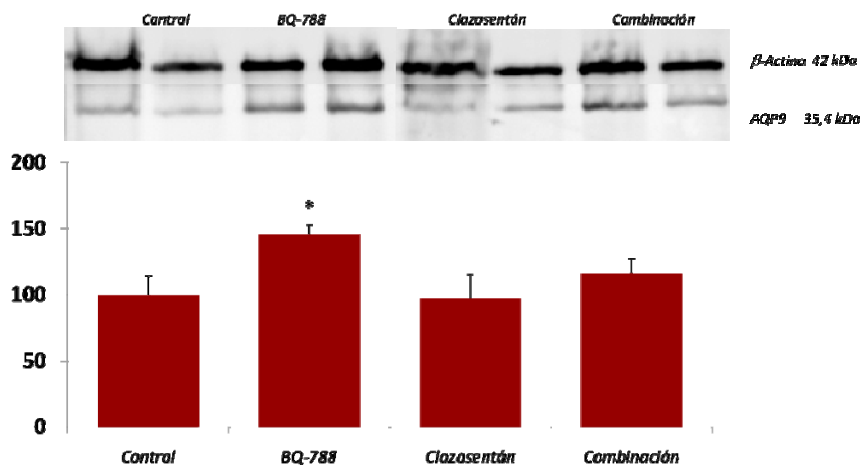
6.2.5 Análisis de la influencia de los diferentes tratamientos sobre la producción de AQP4, AQP9 en cerebro de rata tras la inducción de isquemia

a) **AQP4.** Al analizar cómo influyen los diferentes tratamientos sobre la expresión de la AQP4, vimos que únicamente el tratamiento con el antagonista específico del receptor A de la ET-1, el Clazosentán, indujo una reducción significativa con respecto al grupo control ($p=0.0049$). En cuanto al tratamiento combinado pareció inducir una disminución de los niveles de AQP4, pero las diferencias no fueron significativas. En cambio el grupo tratado con BQ-788 indujo un aumento no significativo en los niveles de AQP4 (Gráfica 23).



Gráfica 23. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la expresión de la AQP4 en cerebro isquémico de ratas. * indica $p < 0.05$, ** indica $p \leq 0.01$, *** indica $p \leq 0.0001$, comparado con el grupo control.

b) AQP9. Al analizar la expresión de la AQP9, observamos que el tratamiento con el antagonista específico del receptor B de la ET-1 indujo un aumento significativo en la producción de AQP9 con respecto al grupo control ($p=0.0408$). Sin embargo la administración del Clazosentán, no indujo diferencias con respecto al grupo control. Las diferencias que indujo el tratamiento combinado no fueron significativas. Si observamos las gráficas de producción de las dos AQPs, encontramos que aquellas ratas que fueron tratadas con el antagonista específico del receptor B tienen mayores niveles de proteína que los que están tratados con el antagonista del receptor A y el tratamiento de combinación tanto para la AQP4 como para la AQP9 (**Gráfica 24**).



Gráfica 24. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la expresión de la AQP9 en cerebro isquémico de ratas. * indica $p < 0.05$, comparado con el grupo control.

6.3. ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA ET-1 CON EL GRADO DE EDEMA EN PACIENTES CON ICTUS ISQUÉMICO

6.3.1. Descripción de la muestra

Se incluyeron un total de 302 pacientes con ictus isquémico no lacunar (51.3% hombres, edad media 74.2 ± 12.3 años) de menos de 12 horas de evolución desde el inicio de la sintomatología, sometidos a tratamiento trombolítico (8.3%) o no. La puntuación media en la escala NIHSS en el momento del ingreso fue de 7 [3-15], y en la escala de Rankin modificada a los 3 meses fue de 2 [1-5]. En cuanto al edema, los pacientes fueron agrupados según los criterios de clasificación previamente expuestos, o según los criterios ASPECTS. Teniendo en cuenta lo anterior los pacientes que desarrollaron edema cerebral grave fueron 12 (4.1%) y los que no desarrollaron edema o desarrollaron edema leve fueron 283 (95.9%). En cuanto a la clasificación del edema por la escala ASPECTS, los pacientes con valores ≤ 7 fueron 73 (24.2%) y aquéllos con valores > 7 fueron 229 (75.8%). El volumen medio del infarto en los pacientes fue de 49.9 ± 93.3 mL. 141 pacientes (47%) presentaron mal pronóstico a los 3 meses. 15 pacientes (5%) desarrollaron deterioro neurológico precoz. El nivel medio de ET-1 en el momento del ingreso fue 3.1 ± 2.8 fmol/mL.

6.3.2. Frecuencias de los polimorfismos del gen de la ET-1

En las Tablas 4, 5 y 6 se exponen las frecuencias genotípicas (izquierda) y las frecuencias fenotípicas (derecha) de cada uno de los SNPs de estudio

rs5370	n (%)	rs5370	n (%)
Homocigoto salvaje	190 (62.9)	Sin polimorfismo	190 (62.9)
Heterocigoto	95 (31.5)	Con polimorfismo	112 (37.1)
Homocigoto mutante	17 (5.6)		

Tabla 4. Frecuencias genotípicas (izquierda) y fenotípicas (derecha) del SNP rs5370.

rs1800541	n (%)	rs1800541	n (%)
Homocigoto salvaje	198 (65.6)	Sin polimorfismo	198 (65.6)
Heterocigoto	93 (30.8)	Con polimorfismo	104 (34.4)
Homocigoto mutante	11 (3.6)		

Tabla 5. Frecuencias genotípicas (izquierda) y fenotípicas (derecha) del SNP rs1800541.

rs2071942	n (%)	rs2071942	n (%)
Homocigoto salvaje	130 (43)	Sin polimorfismo	130 (43)
Heterocigoto	35 (11.6)	Con polimorfismo	172 (57)
Homocigoto mutante	137 (45.4)		

Tabla 6. Frecuencias genotípicas (izquierda) y fenotípicas (derecha) del SNP rs2071942.

6.3.3. Comprobación del equilibrio de Hardy-Weinberg

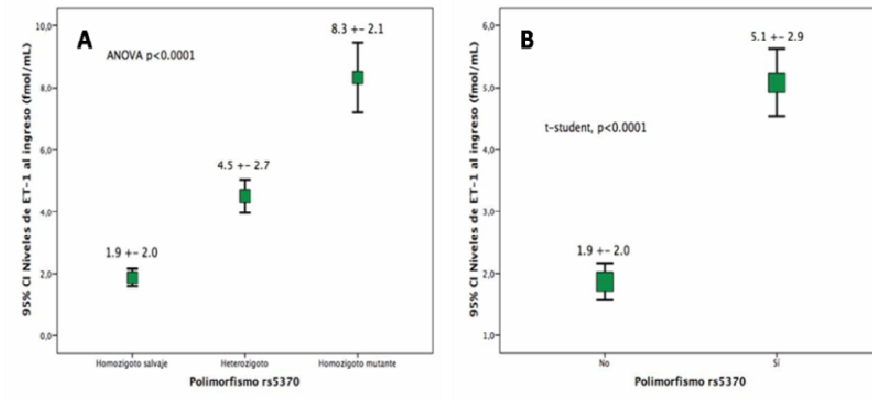
Realizamos la comparación mediante χ^2 de las frecuencias genotípicas de nuestra población de estudio y una población de referencia cuyas frecuencias genotípicas se encuentran registradas en la base de datos Syngle Nucleotide Polymorphisms.

Estudio (%)		Single Nucleotide Polymorphisms (%)		Equilibrio de Hardy-Weinberg	
rs5370		rs5370		χ^2	p
Homocigoto salvaje	62.9	Homocigoto salvaje	56.7	1.957	0.1618
Heterocigoto	31.5	Heterocigoto	38.3		
Homocigoto mutante	5.6	Homocigoto mutante	5		
rs1800541		rs1800541		χ^2	p
Homocigoto salvaje	65.6	Homocigoto salvaje	66.7	2.16	0.140
Heterocigoto	30.8	Heterocigoto	31.7		
Homocigoto mutante	3.6	Homocigoto mutante	1.7		

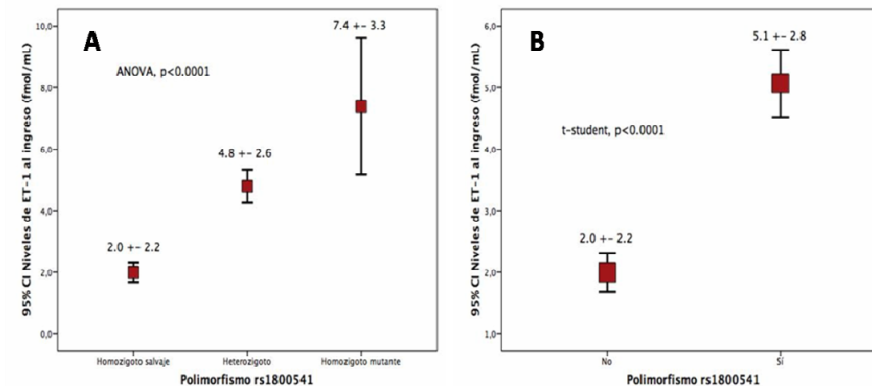
Tabla 7. Comprobación equilibrio Hardy-Weinberg en las frecuencias genotípicas de los SNPs de interés en la población de estudio y una población europea de referencia. Si $p < 0.05$ la población no está en equilibrio de Hardy-Weinberg.

6.3.4. Asociación de los polimorfismos del gen de la ET-1 con los niveles séricos de ET-1

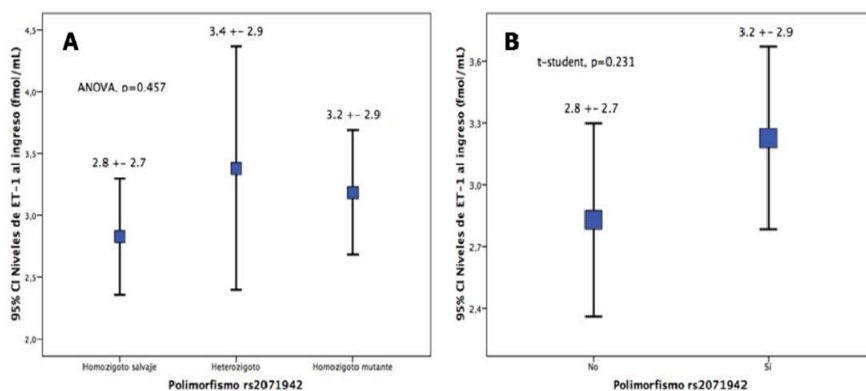
La presencia de los SNPs rs5370 y rs1800541 se asocia significativamente con los niveles séricos de ET-1 en el momento del ingreso, no así el SNP rs2071942. Los análisis se realizaron en función de los genotipos de los pacientes para cada uno de los SNPs, y en función de la presencia o ausencia del SNP en el paciente (Gráficas 25 a 27)



Gráfica 25. Asociación del SNP rs5370 con los niveles séricos de ET-1 al ingreso. A) En función de los genotipos. B) En función de la presencia o ausencia del SNP. Las cajas muestran los cuartiles (límites de las cajas) y el intervalo de confianza.

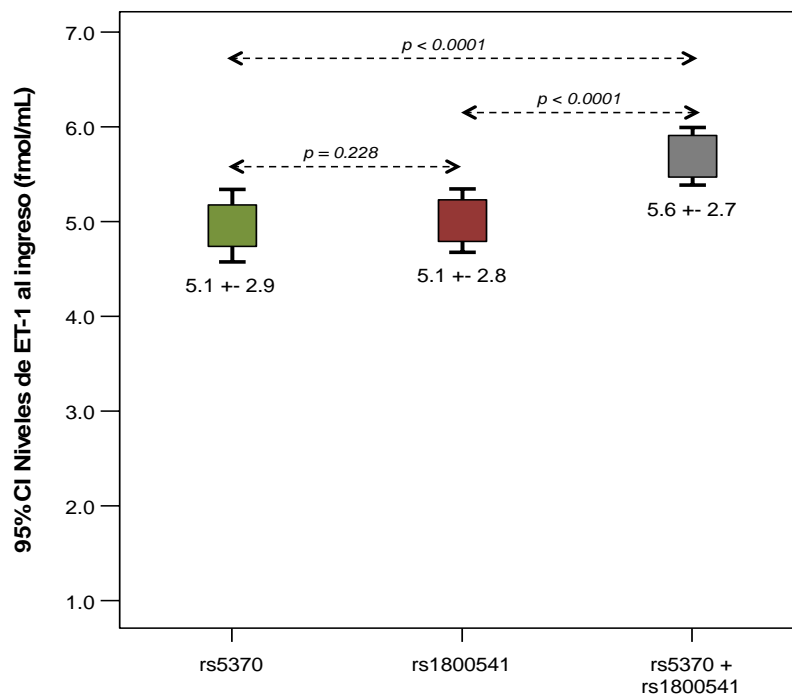


Gráfica 26. Asociación del SNP rs1800541 con los niveles séricos de ET-1 al ingreso. A) En función de los genotipos. B) En función de la presencia o ausencia del SNP. Las cajas muestran los cuartiles (límites de las cajas) y el intervalo de confianza.



Gráfica 27. Asociación del SNP rs2071942 con los niveles séricos de ET-1 al ingreso. A) En función de los genotipos. B) En función de la presencia o ausencia del SNP. Las cajas muestran los cuartiles (límites de las cajas) y el intervalo de confianza.

Cuando estudiamos aquellos pacientes que presentan de forma conjunta los SNPs rs5370 y rs1800541 ($n=86$, 28.5%), observamos que mostraban un aumento significativo en los niveles de ET-1 con respecto a los pacientes que presentaban cada uno de los SNPs por separado (*Gráfica 28*).



Gráfica 28. Comparativa de la influencia de la presencia conjunta de los SNPs rs5370 y rs1800541 con la presencia de un único SNP, en los niveles de ET-1 al ingreso.

Tras realizar el correspondiente estudio univariado, estableciendo como variable dependiente los niveles séricos de ET-1 al ingreso, observamos que los SNPs rs5370 y rs1800541, la edad, el sexo, la hiperlipidemia, la presencia de fibrilación auricular, el consumo previo de estatinas y anticoagulantes, los niveles al ingreso de plaquetas, leucocitos, INR y proteína C reactiva, tipo de ictus según los criterios TOAST y el valor en la escala NIHSS en el momento del ingreso se asociaron significativamente con los niveles de ET-1 al ingreso (*Tabla 8*).

	Coef. Pearson	p	Coef. Spearman	p
Edad	0.162	0.005		
Sexo			0.176	0.002
Antecedente de HTA (%)			-0.028	0.630
Antecedente de DM (%)			-0.098	0.088
Antecedente de tabaquismo (%)			-0.036	0.530
Antecedente de enolismo (%)			-0.089	0.125
Antecedente de hiperlipidemia (%)			-0.173	0.003
Antecedente de CI (%)			-0.078	0.178
Antecedente de FA (%)			0.167	0.004
Estatinas previas (%)			-0.132	0.022
Antiagregantes previos (%)			-0.016	0.788
Anticoagulantes previos (%)			0.184	0.001
Temperatura al ingreso (°C)	0.006	0.919		
PAS al ingreso (mm Hg)	-0.039	0.505		
PAD al ingreso (mm Hg)	-0.068	0.236		
Glucemia al ingreso (mg/dL)	0.089	0.129		
Leucocitos al ingreso ($\cdot 10^3$/mL)	0.196	0.001		
Plaquetas al ingreso ($\cdot 10^3$/mL)	0.116	0.045		
INR al ingreso	0.135	0.022		
Fibrinógeno al ingreso (mg/dL)	0.086	0.164		
Proteína C reactiva al ingreso (mg/dL)	0.132	0.039		
Tratamiento trombolítico (%)			0.032	0.585
Inclusión en ensayos clínicos (%)			0.047	0.411
Diagnóstico TOAST			-0.174	0.002
NIHSS al ingreso			0.459	<0.0001
SNP rs5370			0.649	<0.0001
SNP rs1800541			0.610	<0.0001
SNP rs2071942			0.052	0.365
SNP rs5370 categorizado			0.631	<0.0001
SNP rs1800541 categorizado			0.606	<0.0001

Tabla 8. Estudio univariado de todas las variables de estudio, utilizando los coeficientes de Pearson y Spearman.

Los polimorfismos rs5370 (B: 1.632; IC 95%, 0.974-2.289, $p < 0.0001$) y rs1800541 (B: 1.103; IC 95%, 0.447-1.760, $p < 0.0001$) estaban independientemente asociados con los niveles de ET-1 al ingreso,

después de ajustar por todas aquellas variables significativamente asociadas con los niveles de ET-1 en el análisis univariado (**Tabla 9**).

<i>Modelo A</i>	<i>B ajustada 95% IC</i>	<i>p</i>
Sexo	0.660 (0.084 a 1.237)	0.025
Leucocitos al ingreso	0.129 (0.033 a 0.226)	0.009
Proteína C reactiva al ingreso	-0.056 (-0.106 a -0.005)	0.031
NIHSS al ingreso	0.065 (0.017 a 0.113)	0.008
SNP rs5370	1.632 (0.974 a 2.289)	<0.0001
SNP rs1800541	1.103 (0.447 a 1.760)	<0.0001

Tabla 9. Estudio multivariado, variable dependiente: niveles de ET-1 al ingreso. Valores de B, una vez ajustada la asociación de la presencia de los SNPs con los niveles de ET-1, por las variables que resultaron significativas en el estudio univariado (además de las expuestas: edad, hiperlipidemia, fibrilación auricular, estatinas previas, anticoagulantes previos, plaquetas al ingreso, INR al ingreso, diagnóstico TOAST).

Los polimorfismos categorizados (presencia o ausencia del polimorfismo) estaban también independientemente asociados con los niveles de ET-1 al ingreso (B: 1.458; IC 95%, 0.663-2.253, $p < 0.0001$, en el caso del SNP rs5370 categorizado); (B: 1.614; IC 95%, 0.854-2.374, $p < 0.0001$, en el caso del SNP rs1800541 categorizado) (**Tabla 10**).

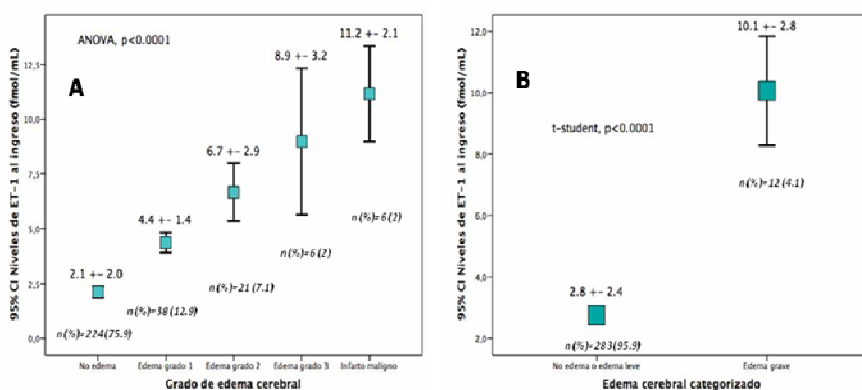
<i>Modelo B</i>	<i>B ajustada 95% IC</i>	<i>p</i>
Sexo	0.729 (0.139 a 1.325)	0.017
Leucocitos al ingreso	0.135 (0.035 a 0.235)	0.008
Proteína C reactiva al ingreso	-0.055 (-0.107 a -0.003)	0.038
NIHSS al ingreso	0.079 (0.030 a 0.129)	0.002
SNP rs5370 categorizado	1.458 (0.663 a 2.253)	<0.0001
SNP rs1800541 categorizado	1.614 (0.854 a 2.374)	<0.0001

Tabla 10. Estudio multivariado, variable dependiente: niveles de ET-1 al ingreso. Valores de B, una vez ajustada la asociación de la presencia de los SNPs categorizados con los niveles de ET-1, por las variables que resultaron significativas en el estudio univariado (además de las expuestas: edad, hiperlipidemia, fibrilación

auricular, estatinas previas, anticoagulantes previos, plaquetas al ingreso, INR al ingreso, diagnóstico TOAST).

6.3.5. Asociación de los niveles séricos de ET-1 con el edema cerebral

Los niveles séricos de ET-1 fueron mayores cuanto mayor era el grado de edema; y si el edema se clasificaba en grave o no grave, los pacientes con edema grave presentaron los niveles más elevados de ET-1 (*Gráfica 29*).



Gráfica 29. Asociación del grado de edema, según los criterios expuestos, con los niveles de ET-1 en el momento del ingreso. A) Graduación edema. B) Categorización grados de edema: Ausencia edema y presencia edema.

Al realizar el correspondiente estudio univariado, estableciendo como variable dependiente la graduación del edema, encontramos que el sexo, los valores de glucemia y los niveles de leucocitos, proteína C reactiva, y el valor en la escala NIHSS que presentan los pacientes en el momento del ingreso se asociaron significativamente con el desarrollo de edema grave (*Tabla 11*).

	Ausencia de edema o edema leve	Edema grave	p
Edad	74.5±12.3	81.5±8.2	0.255
Hombres (%)	53.0	16.7	0.017
Antecedente de HTA (%)	60.4	50.0	0.552
Antecedente de DM (%)	26.1	25.0	0.615
Antecedente de tabaquismo (%)	16.3	0	0.224
Antecedente de enolismo (%)	11.3	8.3	0.603
Antecedente de hiperlipidemia (%)	32.2	16.7	0.351
Antecedente de CI (%)	15.5	8.3	0.700
Antecedente de FA (%)	20.8	41.7	0.143
Estatinas previas (%)	21.6	0	0.131
Antiagregantes previos (%)	21.2	16.7	0.521
Anticoagulantes previos (%)	4.6	8.3	0.448
Temperatura al ingreso (°C)	36.3±0.5	36.4±0.6	0.351
PAS al ingreso (mm Hg)	152.9±28.5	158.1±28.2	0.369
PAD al ingreso (mm Hg)	81.3±17.4	70.9±15.9	0.060
Glucemia al ingreso (mg/dL)	139.6±61.5	219.4±136.2	0.002
Leucocitos al ingreso ($\cdot 10^3$/mL)	8.9±3.1	12.2±2.9	0.002
Plaquetas al ingreso ($\cdot 10^3$ /mL)	238.6±84.8	289.4±149.4	0.235
INR al ingreso	1.1±0.4	1.1±0.1	0.715
Fibrinógeno al ingreso (mg/dL)	472.6±121.3	506.4±176.5	0.395
Proteína C reactiva al ingreso (mg/dL)	2.7±5.7	8.3±14.9	0.028
Tratamiento trombolítico (%)	8.8	0	0.608
Inclusión en ensayos clínicos (%)	9.5	16.7	0.899
Diagnóstico TOAST			0.002
Cardioembólico (%)	40.3	33.2	
Aterotrombótico (%)	12.4	0	
Indeterminado (%)	47.3	66.7	
NIHSS al ingreso	7 (2, 14)	18 (16, 22)	<0.0001

Tabla 11. Estudio univariado, variable dependiente: graduación edema.

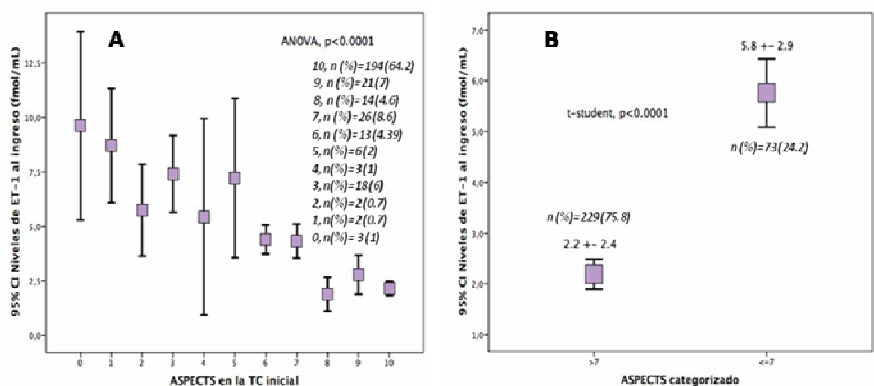
Al introducir la ET-1 en el modelo multivariado correspondiente realizado con las variables que resultaron significativas en el estudio univariado (sexo, glucemia, leucocitos, proteína C reactiva y NIHSS

recogidos en el momento del ingreso), encontramos que la ET-1 se encuentra asociada independientemente con el grado de edema (OR: 2.362; IC 95%, 1.382-4.038, $p<0.002$) (*Tabla 12*).

	OR ajustada 95% IC	P
Sexo	9.267 (0.204 a 420.550)	0.253
Leucocitos al ingreso	0.856 (0.556 a 1.317)	0.479
Proteína C reactiva al ingreso	1.125 (0.967 a 1.308)	0.128
NIHSS al ingreso	1.054 (0.874 a 1.271)	0.584
Glucemia	1.012 (0.996 a 1.027)	0.141
Endotelina-1	2.362 (1.382 a 4.038)	0.002

Tabla 12. Estudio multivariado, variable dependiente: graduación de edema. Valores de OR de la asociación de ET-1 con el desarrollo de edema grave, ajustados por las variables que resultaron significativas en el estudio univariado.

Al utilizar la escala ASPECTS para valorar el edema encontramos que, como sucedía en el caso de la graduación del edema, los niveles séricos de ET-1 eran mayores cuanto más cercano a 0 era la puntuación obtenida en la escala ASPECTS. Si se clasificaba el edema teniendo en cuenta el punto de corte de la escala ASPECTS, los pacientes con valores ≤ 7 presentaban mayores niveles séricos de ET-1 (*Gráfica 30*).



Gráfica 30. Relación del grado de edema, según criterios ASPECTS, con los niveles de ET-1 en el momento del ingreso. A) Graduación edema B) Categorización edema: Valor > o ≤ 7 en la escala ASPECTS

Al realizar el correspondiente estudio univariado, estableciendo como variable dependiente el desarrollo de edema evaluado por la escala ASPECTS, encontramos que la edad, la temperatura, los niveles de leucocitos, los niveles de proteína C reactiva y la puntuación en la escala NIHSS al ingreso estaban independientemente asociados con el desarrollo de edema de una puntuación ≤ 7 en la escala ASPECTS.

Igualmente hallamos que el subtipo de ictus isquémico, según los criterios TOAST, también se encontraba asociado con el desarrollo de edema correspondiente a una puntuación ≤ 7 en la escala ASPECTS (Tablas 13 y 14).

	>7	≤7	p
Edad	73.3±12.3	79.4±10.8	0.001
Hombres (%)	54.1	42.5	0.106
Antecedente de HTA (%)	62.0	53.4	0.218
Antecedente de DM (%)	26.6	26.0	0.999
Antecedente de tabaquismo (%)	15.7	15.1	0.999
Antecedente de enolismo (%)	10.9	11.0	0.999
Antecedente de hiperlipidemia (%)	34.1	24.7	0.150
Antecedente de CI (%)	16.6	12.3	0.461

Antecedente de FA (%)	19.2	28.8	0.102
Estatinas previas (%)	22.3	13.7	0.113
Antiagregantes previos (%)	21.8	20.5	0.871
Anticoagulantes previos (%)	3.5	8.2	0.111
Temperatura al ingreso (°C)	36.3±0.5	36.2±0.5	0.044
PAS al ingreso (mm Hg)	154.3±28.7	148.9±25.6	0.528
PAD al ingreso (mm Hg)	81.4±17.5	78.9±17	0.232
Glucemia al ingreso (mg/dL)	138.9±61.9	150.6±75.3	0.082
Leucocitos al ingreso ($\cdot 10^3$/mL)	8.9±2.9	9.6±3.4	0.003
Plaquetas al ingreso ($\cdot 10^3$ /mL)	241.5±85.6	239.0±95.6	0.918
INR al ingreso	1.1±0.4	1.1±0.2	0.107
Fibrinógeno al ingreso (mg/dL)	464.16±114.2	497.6±142.5	0.076
Proteína C reactiva al ingreso (mg/dL)	2.5±5.9	3.7±6.6	<0.0001
Tratamiento trombolítico (%)	7.4	11.00	0.336

Tabla 13. Estudio univariado, variable dependiente: clasificación edema, según escala ASPECTS.

	>7	≤7	p
Inclusión en ensayos clínicos (%)	8.7	16.0	0.195
Diagnóstico TOAST			0.035
Cardioembólico (%)	35.8	52.1	
Aterotrombótico (%)	13.1	6.8	
Indeterminado (%)	51.1	41.1	
NIHSS al ingreso	5 (2, 11)	17 (13, 20)	<0.0001

Tabla 14. Continuación Tabla 13. Estudio univariado, variable dependiente: clasificación edema, según escala ASPECTS.

Al introducir la ET-1 en el modelo multivariado correspondiente realizado con las variables que resultaron significativas en el estudio univariado, encontramos que la ET-1 se encontraba asociada independientemente con el desarrollo de edema correspondiente a un valor en la escala ASPECTS ≤7 (OR: 1.446; IC 95%, 1.241-1.685, $p<0.0001$) (Tabla 15).

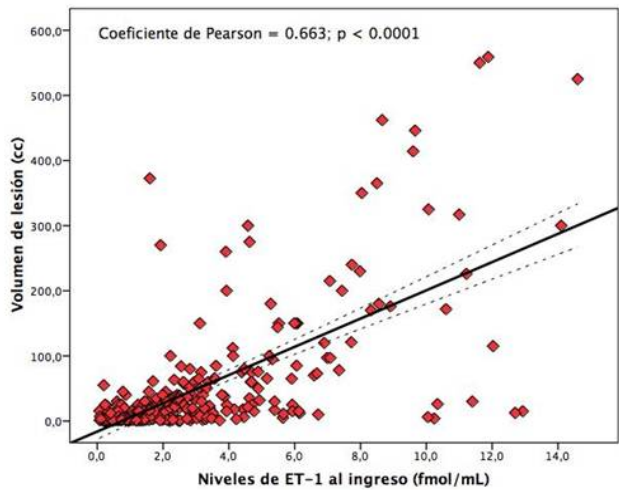
	OR ajustada 95% IC	P
Edad	1.015 (0.976-1.056)	0.459

Temperatura	0.562 (0.251-1.258)	0.161
Leucocitos	0.994 (0.876-1.127)	0.922
PCR	0.996 (0.942-1.052)	0.873
Cardioembólico vs. aterotrombótico	1.159 (0.346-6.668)	0.580
Indeterminado vs. aterotrombótico	0.773 (0.331-1.805)	0.552
NIHSS	1.197 (1.118-1.283)	<0.0001
Endotelina-1	1.446 (1.241-1.685)	<0.0001

Tabla 15. Estudio multivariado, variable dependiente: clasificación de edema según escala ASPECTS. Valores de OR de la asociación de ET-1 con una puntuación en la escala ASPECTS ≤7.

6.3.6. Asociación de los niveles séricos de ET-1 con el volumen de infarto

Al estudiar la asociación entre el volumen de infarto y los niveles séricos de ET-1 encontramos que ambas variables se encontraban asociadas significativamente (Coeficiente de Pearson=0.663, $p<0.0001$) (*Gráfica 31*).



Gráfica 31. Relación de la ET-1 con los volúmenes de infarto

Al realizar el correspondiente estudio univariado, estableciendo como variable dependiente el volumen de la lesión encontramos que las siguientes variables se encontraban estadísticamente asociadas con éste: antecedentes de fibrilación auricular, el uso previo de anticoagulantes y los niveles de glucemia, leucocitos, proteína C reactiva y la puntuación obtenida en la escala NIHSS en el momento del ingreso. Igualmente encontramos que la inclusión en un ensayo clínico, el subtipo de ictus según los criterios TOAST, y la transformación hemorrágica se encontraban asociadas con un mayor volumen de infarto (Tabla 16).

	Coef. Pearson	p	Coef. Spearman	p
Edad	0.073	0.206		
Sexo			0.143	0.013
Antecedente de HTA (%)			-0.049	0.395
Antecedente de DM (%)			-0.036	0.533
Antecedente de tabaquismo (%)			-0.006	0.919
Antecedente de enolismo (%)			-0.042	0.463

Antecedente de hiperlipidemia (%)	-0.056	0.337
Antecedente de CI (%)	-0.053	0.360
Antecedente de FA (%)	0.184	0.001
Estatinas previas (%)	-0.080	0.116
Antiagregantes previos (%)	0.027	0.642
Anticoagulantes previos (%)	0.170	0.003
Temperatura al ingreso (°C)	-0.054	0.350
PAS al ingreso (mm Hg)	0.038	0.508
PAD al ingreso (mm Hg)	-0.069	0.229
Glucemia al ingreso (mg/dL)	0.174	0.003
Leucocitos al ingreso (-10³/mL)	0.165	0.004
Plaquetas al ingreso (-10 ³ /mL)	0.052	0.373
INR al ingreso	0.064	0.281
Fibrinógeno al ingreso (mg/dL)	0.036	0.555
Proteína C reactiva al ingreso (mg/dL)	0.219	0.001
Tratamiento trombolítico (%)	0.110	0.056
Inclusión en ensayos clínicos (%)	0.174	0.002
Diagnóstico TOAST	-0.165	0.004
NIHSS al ingreso	0.651	<0.0001
Transformación hemorrágica	0.649	<0.0001

Tabla 16. Estudio univariado, variable dependiente: volumen de infarto.

Al introducir la ET-1 en el modelo multivariado correspondiente, realizado con las variables que resultaron significativas en el estudio univariado, encontramos que los niveles séricos de ET-1 en el momento del ingreso, se encontraban asociados independientemente con un mayor volumen de infarto (B:19.787; IC 95%, 16.148-23.426, p<0.0001) (Tabla 17).

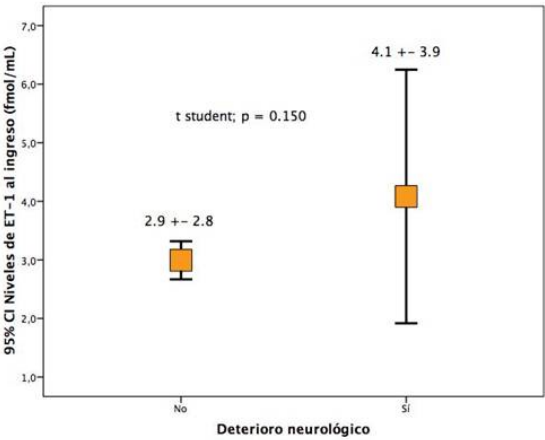
	B ajustada 95% IC	P
Sexo	-17.118 (-35.181 a 0.945)	0.063
Fibrilación auricular	-2.987 (-28.336 a 22.363)	0.817
Anticoagulantes previos	-4.793 (-49.123 a 39.541)	0.831
Glucemia al ingreso	0.141 (0.002 a 0.279)	0.047
Leucocitos al ingreso	-0.995 (-3.970 a 1.979)	0.510
Proteína C reactiva al ingreso	1.192 (-0.364 a 2.747)	0.133

Diagnóstico TOAST	0.499 (-9.983 a 10.981)	0.925
NIHSS al ingreso	2.283 (0.734 a 3.832)	0.004
Transformación hemorrágica	-0.730 (-13.203 a 11.743)	0.908
Endotelina-1	19.787 (16.148 a 23.426)	<0.0001

Tabla 17. Estudio multivariado, variable dependiente: volumen de infarto. Valores de B de la asociación de ET-1 con un mayor volumen de infarto, ajustados por las variables que resultaron significativas en el estudio univariado.

6.3.7. Asociación de los niveles séricos de ET-1 con el deterioro neurológico precoz

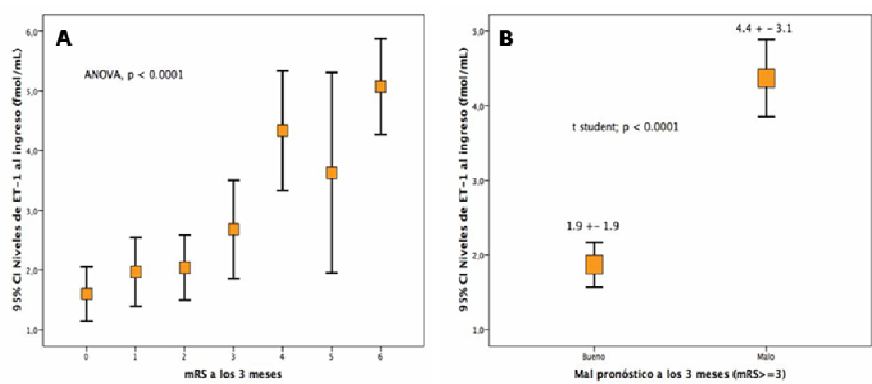
15 pacientes (5%) desarrollaron deterioro neurológico precoz. No se observó una asociación estadísticamente significativa entre la ET-1 y el deterioro neurológico precoz (Gráfica 32).



Gráfica 32. Relación de la ET-1 con el deterioro neurológico precoz categorizado

6.3.8. Asociación de los niveles séricos de ET-1 con el mal pronóstico a los 3 meses

Al estudiar la asociación de la ET-1 con el pronóstico funcional a los 3 meses, encontramos que ambas variables se asociaban independientemente considerando la variable mRS como un variable continua o como una variable categórica (mRS≥3 mal pronóstico, mRS<3 buen pronóstico) (*Gráfica 33*).



Gráfica 33. Asociación entre la ET-1 y el mal pronóstico a los 3 meses

El correspondiente estudio univariado, utilizando como variable dependiente el pronóstico funcional a los 3 meses, reveló que la edad y el sexo de los pacientes, los antecedentes de enolismo y fibrilación auricular, los niveles al ingreso de glucemia, leucocitos, fibrinógeno y proteína C reactiva, la puntuación alcanzada en el momento del ingreso en la escala NIHSS, y el deterioro neurológico, el volumen de la lesión y el edema grave se encontraban asociadas estadísticamente con el mal pronóstico a los 3 meses (*Tabla 18*).

	Bueno	Malo	p
Edad	70.9±11.6	78.7±11.5	<0.0001
Hombres (%)	61.6	39.9	<0.0001

Antecedente de HTA (%)	59.1	60.8	0.814
Antecedente de DM (%)	27.	25.2	0.696
Antecedente de tabaquismo (%)	19.5	11.2	0.056
Antecedente de enolismo (%)	14.5	7.0	0.043
Antecedente de hiperlipidemia (%)	34.6	28.7	0.322
Antecedente de CI (%)	16.4	14.7	0.752
Antecedente de FA (%)	15.1	28.7	0.005
Estatinas previas (%)	24.5	15.4	0.062
Antiagregantes previos (%)	20.1	23.1	0.576
Anticoagulantes previos (%)	2.5	7.0	0.098
Temperatura al ingreso (°C)	36.2±0.5	36.3±0.5	0.309
PAS al ingreso (mm Hg)	152.2±27.9	153.6±28.9	0.101
PAD al ingreso (mm Hg)	81.5±16.6	80.0±18.2	0.435
Glucemia al ingreso (mg/dL)	135.5±56.5	148.2±73.2	0.024
Leucocitos al ingreso ($\cdot 10^3$/mL)	8.3±2.2	9.8±3.4	<0.0001
Plaquetas al ingreso ($\cdot 10^3$ /mL)	230.41±65.8	251.4±105.2	0.142
INR al ingreso	1.1±0.3	1.1±0.4	0.065
Fibrinógeno al ingreso (mg/dL)	448.1±115.5	497.2±124.7	0.001
Proteína C reactiva al ingreso (mg/dL)	1.5±2.3	4.1±8.2	<0.0001
Tratamiento trombolítico (%)	8.2	8.4	0.955
Inclusión en ensayos clínicos (%)	6.9	14.0	0.214
Diagnóstico TOAST			0.303
Cardioembólico (%)	35.8	44.1	
Aterotrombótico (%)	13.2	9.8	
Indeterminado (%)	50.9	46.2	
NIHSS al ingreso	3 (2, 7)	15 (11,19)	<0.0001
Deterioro neurológico (%)	0.6	9.9	<0.0001
Transformación hemorrágica (%)	7.5	14.6	0.242
Volumen de la lesión (mL)	11.8±19.7	87.3±110.2	<0.0001
Edema grave (%)	0	8.8	<0.0001

Tabla 18. Estudio univariado. Variable dependiente: pronóstico a los 3 meses.

Al introducir la ET-1 en el modelo multivariado correspondiente realizado con las variables que resultaron significativas en el estudio univariado, encontramos que los niveles séricos de ET-1 en el momento del ingreso, se encontraban asociados independientemente con el mal

pronóstico a los 3 meses (OR: 1.348; IC 95%, 1.078-1.686, p=0.009) (Tabla 19).

	OR ajustada 95% IC	P
Edad	1.042 (0.991 a 1.095)	0.108
Sexo	1.684 (0.581 a 4.886)	0.337
Enolismo	0.138 (0.018 a 1.033)	0.054
Fibrilación auricular	1.189 (0.323 a 4.382)	0.794
Glucemia	1.005 (0.996 a 1.013)	0.273
Leucocitos	1.103 (0.902 a 1.349)	0.340
Fibrinógeno	1.005 (1 a 1.010)	0.039
PCR	0.958 (0.855 a 1.073)	0.958
NIHSS	1.383 (1.231 a 1.554)	<0.0001
Deterioro neurológico	9.172 (1.328 a 27.349)	0.047
Volumen del infarto	1.019 (1 a 1.038)	0.045
Edema grave	3.251 (0.965 a 16.883)	0.069
Endotelina-1	1.348 (1.078 a 1.686)	0.009

Tabla 19 Estudio multivariado, variable dependiente: mal pronóstico a los 3 meses. Valores de OR de la asociación de ET-1 con el mal pronóstico a los 3 meses, ajustados por las variables que resultaron significativas en el estudio univariado.

6.3.9. Asociación de los polimorfismos del gen de la ET-1 con el edema cerebral, volumen del infarto, deterioro neurológico precoz y pronóstico del infarto a los 3 meses

Evaluamos la independencia de la asociación de los polimorfismos del gen de la ET-1 con las variables de estudio, desarrollo de edema, volumen de infarto, y pronóstico a los 3 meses.

1. Edema

Para la variable de desarrollo edema utilizamos la graduación del edema y escala ASPECTS.

a) Edema grave

Al hacer el análisis multivariado, usando como variable dependiente el edema grave con los dos polimorfismos categorizados, encontramos que ambos polimorfismos se encuentran asociados con el desarrollo del edema grave (*Tablas 20 y 21*).

Variable dependiente:	OR ajustada 95% IC	P
EDEMA GRAVE		
Sexo	6.981 (0.576-84.556)	0.127
Glucemia	1.006 (0.997 a 1.015)	0.193
Leucocitos	1.072 (0.840 a 1.369)	0.575
PCR	1.023 (0.946 a 1.107)	0.569
NIHSS	1.069 (0.913 a 1.253)	0.406
rs5370	6.140 (1.007 a 18.420)	0.007

Tabla 20. Estudio multivariado, variable dependiente: edema grave. Valores de OR de la asociación del SNP rs5370 con el edema grave, ajustados por las variables que resultaron significativas en el estudio univariado.

Variable dependiente:	OR ajustada 95% IC	P
EDEMA GRAVE		
Sexo	6.346 (0.584-68.954)	0.129
Glucemia	1.007 (0.998 a 1.016)	0.119
Leucocitos	1.084 (0.846 a 1.389)	0.525
PCR	1.015 (0.939 a 1.097)	0.711
NIHSS	1.132 (0.978 a 1.311)	0.096
rs1800541	2.834 (1.463 a 17.333)	0.020

Tabla 21. Estudio multivariado, variable dependiente: edema grave. Valores de OR de la asociación del SNP rs1800541 con el edema grave, ajustados por las variables que resultaron significativas en el estudio univariado.

Cuando en el mismo modelo introdujimos la ET-1 observamos que la potencia de la asociación de ambos polimorfismos con el edema grave se redujo en beneficio de la asociación de la ET-1 con el edema grave (*Tablas 22 y 23*).

Variable dependiente:	OR ajustada 95% IC	P
EDEMA GRAVE		
Sexo	69.546 (0.138-3497.894)	0.181
Glucemia	1.009 (0.992 a 1.026)	0.306
Leucocitos	0.814 (0.484 a 1.370)	0.438
PCR	1.185 (0.949 a 1.479)	0.134
NIHSS	0.980 (0.709 a 1.356)	0.904
rs5370	1.208 (0.008 a 36.024)	0.994
Endotelina-1	3.226 (1.390 a 7.4849)	0.006

Tabla 22. Estudio multivariado, variable dependiente: edema grave. Valores de OR de la asociación de los niveles séricos de ET-1 con el edema grave, ajustados por las variables que resultaron significativas en el estudio univariado.

Variable dependiente:	OR ajustada 95% IC	P
EDEMA GRAVE		
Sexo	13.089 (0.183 a 937.891)	0.238
Glucemia	1.011 (0.995 a 1.027)	0.177
Leucocitos	0.853 (0.544 a 1.338)	0.488
PCR	1.130 (0.960 a 1.329)	0.141
NIHSS	1.030 (0.835 a 1.270)	0.781
rs1800541	2.505 (0.105 a 59.813)	0.571
Endotelina-1	2.424 (1.378 a 4.263)	0.002

Tabla 23. Estudio multivariado, variable dependiente: edema grave. Valores de OR de la asociación de los niveles séricos de ET-1 con el edema grave, ajustados por las variables que resultaron significativas en el estudio univariado.

b) ASPECTS ≤7

Por otro lado, al utilizar como variable dependiente un valor en la escala ASPECTS ≤7, hallamos que ambos polimorfismos se asocian con esta variable (*Tablas 24 y 25*).

Variable dependiente:	OR ajustada 95% IC	P
ASPECTS ≤7		
Edad	1.007 (0.966 a 1.050)	0.740
Temperatura	0.505 (0.211 a 1.207)	0.124
Leucocitos	1.047 (0.910 a 1.204)	0.521
PCR	0.957 (0.905 a 1.012)	0.126
TOAST	1.219 (0.752 a 1.977)	0.422
NIHSS	1.225 (1.131 a 1.327)	<0.0001
rs5370	30.311 (10.249 a 89.6449)	<0.0001

Tabla 24. Estudio multivariado, variable dependiente: ASPECTS ≤7. Valores de OR de la asociación del SNP rs5370 con una puntuación en la escala ASPECTS ≤7, ajustados por las variables que resultaron significativas en el estudio univariado.

Variable dependiente:	OR ajustada 95% IC	P
ASPECTS ≤7		
Edad	1.031 (0.993 a 1.072)	0.114
Temperatura	0.474 (0.202 a 1.111)	0.086
Leucocitos	1.050 (0.914 a 1.206)	0.488
PCR	0.953 (0.9 a 1.008)	0.093
TOAST	0.947 (0.602 a 1.490)	0.813
NIHSS	1.251 (1.157 a 1.351)	0.005
rs1800541	17.869 (6.969 a 45.813)	<0.0001

Tabla 25 Estudio multivariado, variable dependiente: ASPECTS ≤7. Valores de OR de la asociación del SNP rs1800541 con una puntuación en la escala ASPECTS ≤7, ajustados por las variables que resultaron significativas en el estudio univariado.

De la misma manera, cuando en el modelo introdujimos la variable correspondiente a la ET-1, encontramos que la potencia de la

asociación de los SNPs con puntuaciones en la escala ASPECTS ≤ 7 , se redujo en beneficio de su asociación con la ET-1 (*Tablas 26 y 27*).

Variable dependiente:	OR ajustada 95% IC	P
ASPECTS ≤ 7		
Edad	1.008 (0.966 a 1.053)	0.706
Temperatura	0.476 (0.194 a 1.171)	0.106
Leucocitos	1.042 (0.905 a 1.199)	0.572
PCR	0.961 (0.906 a 1.018)	0.175
TOAST	1.220 (0.740 a 2.010)	0.435
NIHSS	1.195 (1.100 a 1.298)	<0.0001
rs5370	11.507 (0.840 a 67.620)	0.074
Endotelina-1	1.393 (1.010 a 1.408)	0.003

Tabla 26. Estudio multivariado, variable dependiente: ASPECTS ≤ 7 . Valores de OR de la asociación de los niveles séricos de ET-1 con una puntuación en la escala ASPECTS ≤ 7 , ajustados por las variables que resultaron significativas en el estudio univariado.

Variable dependiente:	OR ajustada 95% IC	P
ASPECTS ≤ 7		
Edad	1.028 (0.988 a 1.069)	0.174
Temperatura	0.454 (0.188 a 1.095)	0.079
Leucocitos	1.038 (0.901 a 1.195)	0.609
PCR	0.959 (0.906 a 1.016)	0.160
TOAST	0.946 (0.594 a 1.508)	0.817
NIHSS	1.218 (1.124 a 1.3199)	<0.0001
rs1800541	7.0026 (0.866 a 33.127)	0.077
Endotelina-1	1.396 (1.017 a 1.407)	<0.0001

Tabla 27. Estudio multivariado, variable dependiente: ASPECTS ≤ 7 . Valores de OR de la asociación de los niveles séricos de ET-1 con una puntuación en la escala ASPECTS ≤ 7 , ajustados por las variables que resultaron significativas en el estudio univariado.

2. Volumen de infarto

Al hacer el análisis multivariado, usando como variable dependiente el volumen del infarto con los dos polimorfismos categorizados, observamos que la presencia de cada uno de los dos polimorfismos se encuentra asociado con el volumen de infarto (*Tablas 28 y 29*).

Variable dependiente:	B ajustada 95% IC	P
VOLUMEN DE INFARTO		
Sexo	-2.068 (-22.923 a 18.788)	0.845
Fibrilación auricular	9.840 (-19.768 a 39.458)	0.513
Anticoagulantes	3.713 (-47.753 a 55.179)	0.887
Glucemia	0.147 (-0.014 a 0.309)	0.074
Leucocitos	1.170 (-2.265 a 4.605)	0.503
PCR	0.413 (-1.400 a 2.226)	0.654
TOAST	6.382 (-6.084 a 18.849)	0.314
NIHSS	3.620 (1.802 a 5.438)	<0.0001
Transformación hemorrágica	1.397 (-13.145 a 15.938)	0.850
rs5370	66.088 (41.666 a 90.5129)	<0.0001

Tabla 28. Estudio multivariado, variable dependiente: volumen de infarto. Valores de OR de la asociación del SNP rs5370 con el volumen de infarto ajustados por las variables que resultaron significativas en el estudio univariado.

Variable dependiente:	B ajustada 95% IC	p
VOLUMEN DE INFARTO		
Sexo	-1.985 (-23.198 a 19.229)	0.854
Fibrilación auricular	7.794 (-22.276 a 37.863)	0.610
Anticoagulantes	-1.167 (-53.719 a 51.385)	0.965
Glucemia	0.197 (0.034 a 0.360)	0.018
Leucocitos	1.130 (-2.362 a 4.622)	0.524
PCR	0.303 (-1.549 a 2.154)	0.748
TOAST	2.685 (-9.787 a 15.156)	0.672
NIHSS	4.417 82.653 a 6.182)	<0.0001
Transformación hemorrágica	6.886 (-7.745 a 21.517)	0.355
rs1800541	53.155 (29.997 a 76.313)	<0.0001

Tabla 29. Estudio multivariado, variable dependiente: volumen de infarto. Valores de OR de la asociación del SNP rs1800541 con el volumen de infarto ajustados por las variables que resultaron significativas en el estudio univariado.

Nuevamente, la introducción en el modelo de la variable ET-1, produjo una reducción en la potencia de la asociación de los polimorfismos con el volumen de infarto, en beneficio de la asociación de la ET-1 con el volumen de infarto (**Tablas 30 y 31**).

<i>Variable dependiente:</i>	<i>B ajustada 95% IC</i>	<i>P</i>
VOLUMEN DE INFARTO		
Sexo	-15.190 (-33.286 a 2.907)	0.100
Fibrilación auricular	0.173 (-25.287 a 25.633)	0.989
Anticoagulantes	-6.252 (-50.393 a 37.889)	0.780
Glucemia	0.130 (-0.009 a 0.268)	0.066
Leucocitos	-0.744 (-3.717 a 2.228)	0.622
PCR	1.024 (-0.5385 a 2.582)	0.197
TOAST	2.715 (-7.995 a 13.424)	0.618
NIHSS	1.880 (0.276 a 3.483)	0.022
Transformación hemorrágica	-1.909 (-14.387 a 10.568)	0.763
rs5370	21.075 (-2.067 a 44.216)	0.074
Endotelina-1	18.218 (14.223 a 22.233)	<0.0001

Tabla 30. Estudio multivariado, variable dependiente: volumen de infarto. Valores de OR de la asociación de la ET-1 con el volumen de infarto ajustados por las variables que resultaron significativas en el estudio univariado.

<i>Variable dependiente:</i>	<i>B ajustada 95% IC</i>	<i>P</i>
VOLUMEN DE INFARTO		
Sexo	-16.505 (-34.765 a 1.755)	0.076
Fibrilación auricular	-2.178 (-27.777 a 23.422)	0.867
Anticoagulantes	-5.809 (-50.407 a 38.788)	0.798
Glucemia	0.142 (0.003 a 0.281)	0.045
Leucocitos	-0.921 (-3.916 a 2.073)	0.545
PCR	1.126 (-0.454 a 14.862)	0.162
TOAST	0.840 (-9.749 a 11.4289)	0.876
NIHSS	2.227 (0.660 a 3.795)	0.006
Transformación hemorrágica	-0.560 (-13.073 a 11.954)	0.930
rs1800541	5.522 (-16.574 a 27.617)	0.623
Endotelina-1	19.318 (15.218 a 23.418)	<0.0001

Tabla 31 Estudio multivariado, variable dependiente: volumen de infarto. Valores de OR de la asociación de la ET-1 con el volumen de infarto ajustados por las variables que resultaron significativas en el estudio univariado.

3. Pronóstico a los 3 meses

Al hacer el análisis multivariado, usando como variable dependiente el mal pronóstico a los 3 meses con los dos polimorfismos categorizados, observamos que únicamente la presencia del SNP rs1800541 se encuentra asociado con un peor pronóstico a los 3 meses, no así para el SNP rs5370 (*Tablas 32 y 33*).

<i>Variable dependiente:</i>	<i>OR ajustada 95% IC</i>	<i>P</i>
MAL PRONÓSTICO A LOS 3 MESES		
<i>Edad</i>	1.029 (0.983 a 1.078)	0.223
<i>Sexo</i>	1.595 (0.578 a 4.403)	0.367
<i>Enolismo</i>	0.166 (0.024 a 1.166)	0.071
<i>Fibrilación auricular</i>	0.861 (0.255 a 2.906)	0.810
<i>Glucemia</i>	1.003 (0.996 a 1.010)	0.447
<i>Leucocitos</i>	1.125 (0.930 a 1.361)	0.226
Fibrinógeno	1.005 (1 a 1.010)	0.039
<i>PCR</i>	0.957 (0.831 a 1.102)	0.538
NIHSS	1.374 (1.227 a 1.538)	<0.0001
<i>Deterioro neurológico precoz</i>	3.089 (1.067 a 8.514)	0.015
<i>Volumen</i>	1.018 (1 a 1.037)	0.059
Edema grave	2.782 (1.333 a 6.804)	0.033
<i>rs5370</i>	1.849 (0.638 a 5.428)	0.263

Tabla 32. Estudio multivariado, variable dependiente: mal pronóstico a los 3 meses. Valores de OR de la asociación del SNP rs5370 con el mal pronóstico a los 3 meses ajustados por las variables que resultaron significativas en el estudio univariado.

<i>Variable dependiente:</i>	<i>OR ajustada 95% IC</i>	<i>P</i>
MAL PRONÓSTICO A LOS 3 MESES		
<i>Edad</i>	1.046 (0.997 a 1.098)	0.067
<i>Sexo</i>	1.622 (0.558 a 4.710)	0.374
<i>Enolismo</i>	0.129 (0.019 a 0.871)	0.036
<i>Fibrilación auricular</i>	0.821 (0.229 a 2.945)	0.762
<i>Glucemia</i>	1.004 (0.992 a 1.012)	0.412
<i>Leucocitos</i>	1.180 (0.959 a 1.452)	0.118
<i>Fibrinógeno</i>	1.006 (1.001 a 1.011)	0.024
<i>PCR</i>	0.928 (0.795 a 1.084)	0.347
<i>NIHSS</i>	1.444 (1.269 a 1.644)	<0.0001
<i>Deterioro neurológico precoz</i>	5.104 (1.357 a 13.618)	<0.0001
<i>Volumen</i>	1.009 (0.992 a 1.026)	0.323
<i>Edema grave</i>	1.082 (0.966 a 3.415)	0.053
<i>rs1800541</i>	7.878 (2.313 a 26.834)	0.001

Tabla 33. Estudio multivariado, variable dependiente: mal pronóstico a los 3 meses. Valores de OR de la asociación del SNP rs1800541 con el mal pronóstico a los 3 meses ajustados por las variables que resultaron significativas en el estudio univariado.

Introduciendo en el modelo correspondiente al SNP rs5370 la ET-1, hallamos que ésta estaba independientemente asociada con el mal pronóstico a los 3 meses (**Tabla 34**). Sin embargo, al introducir la ET-1 en el modelo del SNP rs1800541, la asociación previa del SNP con el mal pronóstico no perdía potencia en favor de la asociación de la ET-1 con el mal pronóstico a los 3 meses (**Tabla 34 y 35**).

Variable dependiente:	OR ajustada 95% IC	P
MAL PRONÓSTICO A LOS 3 MESES		
Edad	1.029 (0.982 a 1.078)	0.238
Sexo	1.509 (0.540 a 4.213)	0.433
Enolismo	0.153 (0.021 a 1.124)	0.035
Fibrilación auricular	0.769 (0.220 a 2.687)	0.681
Glucemia	1.003 (0.996 a 1.010)	0.438
Leucocitos	1.104 (0.910 a 1.339)	0.316
Fibrinógeno	1.005 (1 a 1.010)	0.034
PCR	0.959 (0.833 a 1.104)	0.559
NIHSS	1.382 (1.231 a 1.552)	<0.0001
Deterioro neurológico precoz	2.734 (1.013 a 7.44)	0.015
Volumen	1.015 (0.096 a 1.034)	0.118
Edema grave	3.309 (0.918 a 8.546)	0.074
rs5370	1.521 (0.492 a 4.698)	0.466
Endotelina-1	1.372 (1.872 a 3.575)	0.003

Tabla 34. Estudio multivariado, variable dependiente: mal pronóstico a los 3 meses. Valores de OR de la asociación de la ET-1 con el mal pronóstico a los 3 meses ajustados por las variables que resultaron significativas en el estudio univariado.

Variable dependiente:	OR ajustada 95% IC	P
MAL PRONÓSTICO A LOS 3 MESES		
Edad	1.047 (0.997 a 1.099)	0.064
Sexo	1.639 (0.562 a 4.781)	0.365
Enolismo	0.129 (0.019 a 0.860)	0.034
Fibrilación auricular	0.839 (0.231 a 3.040)	0.789
Glucemia	1.004 (0.995 a 1.012)	0.413
Leucocitos	1.186 (0.959 a 1.467)	0.116
Fibrinógeno	1.006 (1.001 a 1.011)	0.024
PCR	0.927 (0.793 a 1.083)	0.340
NIHSS	1.446 (1.270 a 1.647)	<0.0001
Deterioro neurológico precoz	5.378 (1.668 a 31.514)	0.017
Volumen	1.009 (0.991 a 1.028)	0.318
Edema grave	1.227 (0.994 a 2.017)	0.061
rs1800541	8.498 (2.112 a 34.198)	0.003
Endotelina-1	0.956 (0.651 a 1.403)	0.819

Tabla 35. Estudio multivariado, variable dependiente: mal pronóstico a los 3 meses. Valores de OR de la asociación de la ET-1 con el mal pronóstico a los 3 meses ajustados por las variables que resultaron significativas en el estudio univariado.

1. INTRODUCCIÓN
2. JUSTIFICACIÓN
3. HIPÓTESIS
4. OBJETIVOS
5. MATERIAL Y MÉTODOS
6. RESULTADOS
7. DISCUSIÓN
8. CONCLUSIONES
9. BIBLIOGRAFÍA

7.1. EFECTO PROTECTOR DE LOS ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE ET-1 EN COCULTIVOS DE ASTROCITOS Y CÉLULAS ENDOTELIALES DE RATA SOMETIDOS A PRIVACIÓN DE OXÍGENO Y GLUCOSA, Y EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA CEREBRAL

7.1.1. Modelo de cocultivo.

Existen varios modelos de cultivo *in vitro* intentando reproducir el comportamiento de la BHE *in vivo*.

El modelo más simple de BHE consiste en el cultivo de una monocapa de células endoteliales de microvasculatura cerebral, usando un medio de cultivo condicionado con astrocitos¹⁶¹. Otra modalidad es el cocultivo de células endoteliales de microvasculatura en el interior del dispositivo *Transwell Insert* y astrocitos en el fondo del pocillo donde va colocado el inserto, sin que exista contacto entre los dos tipos celulares^{162,163}.

También existe un nuevo tipo de cocultivo que imita el comportamiento de la BHE *in vivo*, cuando está sometido al estrés mecánico que supone el flujo sanguíneo, utilizando los modelos conocidos como “*Hollow fiber*”¹⁶⁴. Estos modelos reciben el nombre genérico de modelos tridimensionales. El principal inconveniente que presenta este modelo es el logístico debido a la infraestructura especial necesaria para su realización.

Finalmente, el modelo que hemos usado en este trabajo consiste en un cocultivo de células endoteliales de microvasculatura del cerebro de

rata, sembradas en la parte interna de los dispositivos *Transwell Insert*, con los astrocitos sembrados en la parte inferior de su membrana, pudiéndose establecer de esta manera un contacto directo entre los dos tipos celulares a través de poros presentes en la superficie del inserto de un diámetro de $0.4\mu\text{m}$ ¹⁶⁵. Este tipo de modelo presenta la principal ventaja con respecto al cultivo de monocapa y al cocultivo sin contacto, de que desarrolla mayores valores de TEER. Esta TEER es la consecuencia de la presencia de las proteínas de unión estrecha, que es más intensa en el cocultivo de contacto. Está demostrado que el contacto directo de los astrocitos influye directamente en una mayor presencia de las proteínas de unión estrecha^{166,167}.

En relación con los valores de la TEER, existen en la bibliografía abundantes métodos de cocultivo presentando valores muy diferentes de este parámetro. Atendiendo a esto podemos suponer que no hay un valor de TEER predeterminado que se pueda definir como máximo. La misma situación ocurre con el tiempo que necesita un cocultivo para alcanzar ese valor máximo de TEER¹⁶⁸. Existen múltiples variables que influyen en este tipo de cultivo, como el tipo de proteína con el que se puede hacer el recubrimiento de las diferentes superficies de crecimiento de las células, lisina o colágeno o sin recubrimiento; el tipo de diámetro de poro que presentan los insertos, la mayoría de los trabajos utilizan insertos con un diámetro de poro de $0,4\mu\text{m}$ aunque también existen trabajos donde utilizan diámetros de poro de $1\mu\text{m}$ ¹⁶⁹; igualmente la especie animal de la que procedan los diferentes tipos celulares empleados en el cocultivo, o la ausencia de determinados suplementos, tales como el suero o hidrocortisona¹⁴⁴⁻¹⁴⁶, en el medio de cultivo. En nuestro caso, tras múltiples ensayos hemos utilizado el

modelo ya descrito en el apartado de *Material y métodos*, obteniendo valores de TEER muy similares a los publicados con anterioridad, tanto en los valores absolutos óptimos de la TEER como con respecto al tiempo en que se alcanza ese óptimo¹⁷⁰. Con el fin de poder revelar mejor los cambios que se producen en la TEER, hemos optado por utilizar una nueva variable, definida como el porcentaje de variación de la TEER con respecto al blanco.

Como ya hemos mencionado, el desarrollo de una buena TEER se debe en gran medida a la presencia de proteínas de uniones estrechas, representada por múltiples componentes. Las proteínas del complejo ZO-1 y la proteína ocludina, se encuentran ampliamente documentadas como marcadores de formación de una buena barrera hematoencefálica^{141,167}. En nuestro caso pudimos ver como la evolución de la TEER se correlacionó con la presencia de las proteínas de unión estrecha. Observamos como existe una correlación entre los valores de TEER antes y después de la POG con el nivel de producción de las proteínas de unión estrecha.

7.1.2. Efecto de la POG sobre la muerte celular.

El modelo más aceptado y utilizado para el estudio de la isquemia cerebral *in vitro* es el de la privación de oxígeno y glucosa (POG, del inglés OGD, oxygen and glucose deprivation)¹⁴⁷. En nuestro caso, los resultados mostraron que la POG provocaba muerte celular medida por LDH a las 24 horas tras el final de la isquemia. Existen varios trabajos, en el que utilizan células endoteliales de la microvasculatura del cerebro, lo someten a isquemia *in vitro* y evalúan el efecto que presenta sobre el parámetro que pretender medir¹⁷¹⁻¹⁷⁴. En los trabajos de *Abbruscato et*

al^{171,172} comprueban el efecto que ejerce la isquemia *in vitro* sobre la permeabilidad aparente de un monocultivo de células endoteliales de microvasculatura de cerebro bovino. Observan que una hora de tratamiento de isquemia combinada con aglicemia produce un aumento en el parámetro de la permeabilidad, empezando a ser significativa cuando la duración de la isquemia es de 3 horas. Podríamos suponer el coeficiente de permeabilidad como una medida indirecta de la muerte celular, de forma que cuanta mayor permeabilidad haya, mayor muerte celular habrá. Atendiendo a esta suposición podríamos establecer que con el tratamiento de isquemia de una hora de duración ya se produce muerte de las células endoteliales.

Otro de los trabajos donde utilizan isquemia *in vitro* es el publicado por *An et al*¹⁷⁴. En este trabajo emplean un tiempo de isquemia muy similar al nuestro pero con un periodo previo de preconditionamiento a la isquemia de media hora y un tiempo de reperusión de 3 horas, observando muerte celular tras ese periodo, pero en menor magnitud que en nuestro caso. Estas diferencias en cuanto a la magnitud de la muerte celular observada, se pueden achacar al preconditionamiento y al menor tiempo de reperusión en comparación con nuestro modelo. En nuestro caso las medidas de LDH fueron realizadas a partir de muestras recogidas tras 24 horas después de acabada la isquemia.

En cambio, en el trabajo publicado por *Haggani et al*¹⁷⁵ utilizan el modelo de POG sometiendo los cultivos a un tiempo máximo de isquemia de 4 horas, recogiendo los extractos celulares a las 24 horas tras el final de la POG para los diferentes experimentos. En comparación con éste, nuestro trabajo presenta un tiempo máximo de isquemia de 150 minutos.

Con respecto a la apoptosis, nuestro modelo provoca un aumento significativo de los niveles de caspasa-3, sin embargo comparado con otros estudios los niveles de caspasa-3 que obtenemos son sensiblemente inferiores, debido probablemente a la acción antiapoptótica de la ET-1, como se ha demostrado en cultivos sometidos a diferentes tipos de estrés¹⁷⁶.

7.1.3. Modelo de isquemia experimental.

Para ayudar a diseñar modelos animales de infarto cerebral más relevantes, que permitan evaluar tratamientos neuroprotectores y neurorreparadores en el ámbito preclínico, en 1999 se publicaron las recomendaciones STAIR que han sido revisados periódicamente desde entonces¹⁷⁷. Una de las recomendaciones más importantes a considerar es la elección correcta del modelo animal a utilizar, ya que no existe un único modelo de infarto cerebral que describa perfectamente todos los aspectos fisiopatológicos involucrados en el ictus.

La mayoría de los estudios a nivel preclínico se realizan en pequeños roedores, especialmente en ratas, ya que la isquemia cerebral es fácilmente inducible en estos animales, sus variables fisiológicas pueden ser monitorizadas y controladas de forma sencilla, y pueden utilizarse en un número suficiente como para lograr un análisis estadístico riguroso sin alcanzar un coste excesivo. Existen modelos de isquemia cerebral tanto global como focal, pudiendo ser transitoria, si la fase de isquemia va seguida de una fase de reperusión, o permanente, si no existe la reperusión posterior¹⁷⁸. A su vez, los modelos de isquemia cerebral focal pueden dividirse en transcraneales, cuando se ocluye la ACM de

forma directa tras realizar una craneotomía, e intraluminares, cuando la ACM se ocluye en su origen mediante un procedimiento intravascular.

Los distintos modelos de isquemia cerebral en rata presentan un desarrollo y evolución temporal de la lesión diferente, dependiendo fundamentalmente del nivel vascular al cual se produce la oclusión y del número de vasos ocluidos.

En experimentos previos de nuestro grupo se han comparado diferentes variables en tres modelos de isquemia cerebral focal permanente diferentes, modelo de oclusión de la ACM por sutura, por electrocoagulación y por oclusión intraluminal. De todos estos modelos, el que presentó mayor volumen de infarto junto con un mayor grado de edema era el de la oclusión intraluminal, como cabía esperar, ya que la oclusión de la ACM en el modelo intraluminal se produce a nivel de la ramificación de la ACM, afectando la isquemia a una mayor extensión de parénquima cerebral, condicionando a una mayor mortalidad. En cambio, en los otros dos modelos la sutura se realiza en un segmento de la ACM más distal, afectando a una menor porción de parénquima cerebral, y por tanto menor grado de edema y menor volumen de infarto. La conclusión principal que pudimos extraer de ese trabajo previo es que para estudios a largo plazo, en los que interese un gran desarrollo de edema y de volumen de infarto, el modelo más adecuado es el de la oclusión intraluminal, como es en nuestro caso, ya que pretendemos evaluar el efecto neuroprotector de los diferentes tratamientos, reflejado en la reducción del grado de edema y del volumen de infarto en los puntos temporales previamente definidos.

Cabe destacar que en el trabajo previo de nuestro grupo los tres modelos que se compararon fueron de tipo permanente. Sin embargo

en trabajos previos se ha demostrado que en los modelos de isquemia transitoria, el restablecimiento de la perfusión 3 horas tras la isquemia no reducía el tamaño del infarto, de forma que tras la isquemia transitoria el daño cerebral resulta tanto de la propia isquemia como de los efectos de la reperusión. Comparado con la oclusión permanente, que emula una pequeña parte de todos los ictus humanos, aquéllos donde no existe recanalización, los modelos transitorios reflejan mejor la situación fisiológica que ocurre tras el tratamiento con trombolíticos o la que ocurre tras un AIT¹⁷⁹.

7.1.4. Efecto protector de los antagonistas de los receptores de ET-1.

In vitro.

a) **Liberación LDH.** Nuestros resultados muestran un claro efecto protector de ambos antagonistas de los receptores de la ET-1, el Clazosentán y el BQ-788, a las tres concentraciones de estudio, reflejado en la disminución de la producción de la LDH, en comparación con el grupo control, 24 horas después de que haya cesado la isquemia.

Sólo hemos hallado un trabajo previo donde se evalúa el efecto neuroprotector de los antagonistas de los receptores de ET-1¹⁸⁰ *in vitro*. En este trabajo previo, utilizando un modelo de cultivo neuronal, y utilizando diferentes concentraciones de un antagonista del receptor A de la ET-1 se encuentran diferencias significativas en la viabilidad celular, cuantificada por el ensayo del MTT. Teniendo en cuenta este trabajo previo, y todos los artículos previos donde se defiende que la administración de los antagonistas del receptor A de la ET-1 en un

modelo animal de isquemia ejercen una función eminentemente neuroprotectora, podemos decir que nuestros resultados son coherentes con lo publicado anteriormente^{126-128,181-183}. A este respecto, *in vitro* cambia con respecto a la situación *in vivo* y por tanto su función. En un animal sano, aunque existen receptores A distribuidos por todas las células del parénquima cerebral, la mayor parte de ellos se encuentran en el músculo liso, ejerciendo funciones vasoconstrictoras, por lo que su bloqueo influirá directamente en la recuperación de la perfusión microvascular normal¹¹⁶. En nuestro modelo, no existen células del músculo liso, por lo que esa función de regulación de la perfusión microvascular no existe. Sin embargo la protección observada puede ser debida al aumento de expresión de determinadas proteínas, como las AQP, debido a que este receptor se encuentra acoplado a proteínas G en el citoplasma, pudiendo estar implicado en múltiples rutas de señalización intracelular^{132,133,184}.

Al observar los grupos tratados con los antagonistas de los receptores B, observamos una reducción de la muerte celular por necrosis, como pudimos ver al analizar los niveles de LDH. No hemos encontrado en la bibliografía ningún artículo donde se evalúen los efectos que pueda tener la adición de antagonista del receptor B a un modelo *in vitro* de BHE, y las únicas referencias para evaluar el efecto del BQ-788 son las de su administración en modelos animales¹³⁰. En estos modelos animales, la administración de BQ-788 tiene un efecto perjudicial sobre el desarrollo de la lesión, en cambio en nuestro estudio *in vitro*, tras la administración del BQ-788 observamos un efecto protector. La explicación a esta aparente incoherencia sobre el efecto final de los antagonistas de los receptores B de ET-1 podría estar en la diferencia que existe en la

distribución de los receptores B en un modelo *in vitro* y en un modelo *in vivo*. El receptor B en el cerebro está distribuido en múltiples tipos celulares del parénquima como astrocitos, microglía o incluso oligodendrocitos donde participa en el proceso de mielinización además de en células endoteliales y células del músculo liso¹⁷⁶. Sin embargo, la función de los receptores B en estos dos últimos tipos celulares es diferente, ya que el receptor B presenta dos subpoblaciones: B1, en células endoteliales vasculares mediando vasodilatación, y B2, en células del músculo liso provocando vasoconstricción¹⁸⁵. Se desconoce si el resto de las células que presentan receptores B presentan estos dos subtipos de receptores y si las funciones que desempeñan son las mismas que las desempeñadas en las células que forman parte del vaso sanguíneo.

Por tanto, en un modelo *in vitro*, al cultivar solamente células endoteliales y astrocitos, el efecto final del antagonismo de los receptores B puede ser diferente a un modelo *in vivo*, primero debido a los tipos celulares cultivados, y en segundo lugar debido a la función específica de los subtipos de receptores B presentes.

Observamos que el efecto protector de los dos antagonistas, tanto del receptor A como del receptor B, es dependiente de la concentración que se ha adicionado al cocultivo. Sin embargo, en las concentraciones altas de cada uno de los antagonistas, observamos que la protección es mucho menor que con las bajas y medias. De la misma manera, cuando evaluamos el efecto conjunto de ambos antagonistas a las concentraciones intermedias, que resultaron más eficaces, observamos que se producía de nuevo una reducción de la muerte celular comparado con el control, sin embargo esta reducción no era tan

marcada como en el caso de la acción de los antagonistas cuando se administraban solos, la explicación a estos resultados podría estar en posibles fenómenos de toxicidad.

b) Niveles de caspasa 3. Al analizar el efecto que presentaba la adición de los antagonistas de los receptores en el cocultivo, encontramos que ninguno de ellos reducía la muerte por apoptosis. La ET-1 es un factor antiapoptótico, por tanto es lógico pensar que su bloqueo mediante antagonistas revertiría ese efecto. De hecho, se ha demostrado el efecto apoptótico de los antagonistas de la ET-1 en el tratamiento de diferentes tumores y líneas celulares inmortalizadas¹⁸⁶. Sin embargo, en nuestro caso los antagonistas a ninguna de las dosis muestra diferencias significativas con respecto al control, ni aumentando ni disminuyendo la muerte celular. Estas divergencias con respecto a los datos publicados, pueden ser debidas al tipo celular empleado en el cultivo, células endoteliales en vez de células tumorales. Debemos recordar que no hemos encontrado en la bibliografía ninguna referencia a la implicación de los antagonistas de ET-1 en la reducción de la apoptosis en células endoteliales. Otra posible explicación a este fenómeno podría ser el momento en el que se analizó esta molécula. Probablemente si se midiese después de las 24 horas se hubiesen obtenido valores diferentes en los niveles de caspasa-3 con respecto al grupo control.

c) Medidas de la TEER. Podemos establecer una relación entre los valores de TEER y la muerte celular, ya que valores altos de TEER dependen de la capacidad que tengan las células *in vitro* de expresar

proteínas de unión estrecha, y por tanto de su viabilidad. Encontramos que los grupos con una recuperación más importante de la TEER tras el final de la POG son aquéllos que han sido tratados con las concentraciones más eficaces de antagonistas en la prevención de la muerte celular.

In vivo

Para evaluar la posible neuroprotección de los antagonistas de los receptores de ET-1 evaluamos las variables grado de edema y volumen de lesión que experimentan los animales incluidos en el estudio a las 6 horas (tras la inducción de isquemia), 24 horas, 72 horas y a los 7 días tras la administración del tratamiento.

Además de estas variables evaluamos el efecto que presentaban los antagonistas en la recuperación funcional, medida por el índice de lateralidad, y en los niveles de ET-1 sérica a las 24 horas, 72 horas y 7 días tras la administración del tratamiento.

Referentes al volumen de lesión y al grado de edema, como ya hemos mencionado, existen multitud de trabajos donde al administrar antagonistas específicos del receptor A se produce una disminución del volumen de la lesión y el grado de edema. En concreto en el trabajo de *Chopp et al*¹⁸¹, administrando conjuntamente tPA con un antagonista específico del receptor A demuestran un claro efecto neuroprotector. En cambio la administración de antagonistas de receptores B producía un agravamiento de la lesión isquémica¹³⁰. Teniendo esto en cuenta, nuestros resultados son coherentes con lo publicado previamente por grupos diversos, aunque nuestros resultados con respecto a la administración del receptor B son diferentes, ya que las diferencias observadas no llegan a ser significativas. Sin embargo se observa una

tendencia en el aumento del volumen de lesión y del grado de edema, de forma que si se aumentase la *n* de los animales incluidos en los diferentes grupos, estas diferencias podrían ser significativas. Debemos comentar que la primera medición tanto del edema como del volumen de lesión se realizó a las 6 horas. Esto es debido, en primer lugar a la metodología que tenemos que utilizar para comprobar la recuperación del FSC tras la operación, considerado como un criterio de exclusión, por lo que se hace necesaria la utilización del Láser-Doppler, cuyo principal inconveniente en nuestro caso, es la incompatibilidad con el uso de la RM. Por otro lado en el periodo de tiempo que abarca desde que se produce la reperfusión tras la isquemia hasta un tiempo de 6 horas no hay contraste en RM. En cuanto se produce la reperfusión del vaso se pierde el contraste que es necesario para poder examinar las imágenes de Difusión, reapareciendo de nuevo el contraste en un tiempo medio de 6 horas.

Por tanto, la principal limitación derivada de esta circunstancia, es el no poder obtener los volúmenes de lesión a tiempo cero, definido como el tiempo cuando comienza la reperfusión y antes de la administración de los tratamientos, no teniendo de esta manera la completa seguridad de que el volumen inicial de lesión sea comparable en todos los animales a estudio.

Teniendo esto en cuenta, la principal crítica a los resultados de la influencia de los diferentes tratamientos sobre el volumen de lesión puede ser el no tener datos anteriores a las 6 horas por RM, no sabiendo si las diferencias significativas que observamos se deben a que los animales presentan volúmenes de lesión inicial mucho menores que el resto de los animales sometidos a los otros tratamientos, o si se trata del

efecto farmacológico de los antagonistas que actuarían muy precozmente tras su administración.

Sin embargo, debemos destacar que los animales fueron asignados aleatoriamente a cada grupo de tratamiento tras su operación, por lo que si los volúmenes de lesión de los animales de los otros grupos presentan volúmenes iniciales de lesión similares, es lógico pensar que todos los animales presentan volúmenes iniciales de lesión similares sin que las diferencias que existan entre los volúmenes sean estadísticamente significativas. Por otro lado, podemos asumir que los volúmenes iniciales de lesión en todas las ratas presentan valores similares debido a la experiencia previa de los operadores, ya que habiendo operado un número elevado de ratas bajo este mismo modelo, éstas presentaban volúmenes de lesión bastante similares.

Teniendo en cuenta esto, podemos afirmar que el efecto que se observa ya a 6 horas en la reducción del volumen de lesión, cuando se trata los animales con la combinación de tratamientos, es debido a la acción farmacológica de los antagonistas de la ET-1 principalmente sobre la musculatura lisa del vaso sanguíneo.

La explicación a por qué el tratamiento combinado de los dos antagonistas (antagonista del receptor A y antagonista B) tiene efectos mucho más importantes en la reducción del volumen de lesión y grado de edema, que el tratamiento por separado de cada uno de los antagonistas podría ser la expuesta en el trabajo de *Fukuroda et al*¹⁸⁷, donde demuestran que la inhibición de la contracción de la arteria pulmonar por parte del tratamiento combinado del BQ-788 y del BQ-123, antagonista del receptor A, es superior a la de cada uno de los tratamientos por separado. Teniendo en cuenta este estudio y otros

previos donde se ha demostrado que el antagonismo de los receptores de ET-1 preserva la perfusión microvascular en el área infartada¹¹⁶, podríamos asumir que parte de las acciones neuroprotectoras de los antagonistas de ET-1 *in vivo*, están mediados por su acción sobre la vasoconstricción en el área donde sucede el episodio isquémico, regulando de alguna manera la perfusión microvascular.

En cuanto a la recuperación funcional, observamos que el tratamiento de combinación no inducía una mayor recuperación funcional como cabría esperar, ya que este tratamiento redujo más frecuentemente el grado de edema y el volumen de lesión. En cambio el tratamiento con Clazosentán resultó ser el más eficaz en la recuperación funcional, cuando no mostró diferencias significativas en el volumen de lesión. Esto puede ser debido a la acción del BQ-788, que disminuiría la acción beneficiosa del Clazosentán cuando se administran conjuntamente, ya que al analizar su influencia en la recuperación funcional observamos que tiene peor recuperación que el propio control. No está claro, de momento, si el BQ-788 pudiera estar provocando efectos deletéreos que no se verían reflejados en los estudios de imagen.

Por último, encontramos que los niveles de ET-1 a las 24 horas no se encuentran influidos por los diferentes tratamientos. En cambio a las 72 horas y a los 7 días, encontramos que el tratamiento con Clazosentán reduce significativamente los niveles de ET-1, lo cual puede ser indicativo de que estén haciendo efecto los receptores ET_b localizados en los órganos periféricos del animal, cuya función principal es la eliminación de la ET-1 circulante¹⁰⁸. Siguiendo esta hipótesis, encontramos una explicación a que a los 7 días los niveles de ET-1 en los

animales tratados con BQ-788, se encuentran elevados con respecto al control, ya que no tienen disponibles los receptores B.

7.1.5. Mecanismo de protección de los antagonistas de los receptores de ET-1: Regulación de AQPs.

En la bibliografía previa se ha planteado la relación entre la ET-1 y el desarrollo del edema cerebral mediando la regulación de la expresión de las acuaporinas. En animales modificados genéticamente para provocar la sobreproducción de ET-1¹³², se observó que tras un episodio de isquemia transitoria, estos animales presentaban mayor déficit neurológico y mayor volumen de infarto, que se normalizaba parcialmente tras la administración de un antagonista del receptor A de la ET-1. En estos animales se observó una expresión aumentada de las AQPs en los pies astrocíticos que rodean los vasos sanguíneos. Sin embargo, en estudios posteriores, tanto *in vivo*, donde la administración de un agonista del receptor B de la ET-1 se hacía a nivel de los ventrículos cerebrales¹³³, como *in vitro*¹⁸⁴, se observaba una reducción en los niveles de AQP4 y AQP9 tras la administración del péptido de la ET-1.

Esta aparente incoherencia se explicaría teniendo en cuenta las condiciones experimentales empleadas en estos estudios. En primer lugar, la sobreproducción de ET-1 en los animales modificados genéticamente, produjo un aumento en la expresión de la AQP4

presente en los astrocitos, pero no afectó a la expresión de la AQP4 en condiciones en las que no existía una patología, sin embargo aquellos animales a los que se les administró el péptido de ET-1 presentaban una reducción en la producción de la AQP4 sin existir condición patológica.

Es de destacar, además, que en el modelo transgénico, los efectos de la sobreproducción de la ET-1 estaban atenuados por un antagonista del receptor A de la ET-1, pero no por un antagonista del receptor B. Tomando en cuenta estos resultados, los receptores cerebrales ETR_A y ETR_B probablemente tengan papeles diferentes en la regulación de la expresión de la AQP4 y de la AQP9.

La expresión de la AQP4 tras un episodio de isquemia transitoria (30 minutos) va en paralelo con el desarrollo del edema: un primer pico a los 30 minutos tras la reperusión y un segundo pico a las 48 horas tras la reperusión¹⁸⁸. Teniendo esto en cuenta, podríamos decir que tras un episodio de isquemia, la respuesta del organismo es la de producir más AQPs, produciéndose igualmente mayores niveles de ET-1, por lo que la ET-1 y las AQPs parecen estar relacionadas a través del desarrollo de edema. Para intentar desvelar si la ET-1 posee algún tipo de papel en la regulación de la AQP-4, en el trabajo de *Yeung et al*¹⁸⁹, se administró un antagonista del receptor de la vasopresina al modelo animal modificado para la sobreexpresión de ET-1 observándose una reducción en la producción de AQP4.

Teniendo en cuenta esto, nuestros análisis de producción de las AQPs son coherentes con lo publicado anteriormente tanto *in vitro* como *in vivo*. Los animales tratados con Clazosentán, antagonista específico del receptor A de la ET-1, presentan menores niveles de AQPs, imposibilitando la entrada de agua al parénquima cerebral en las

primeras fases del desarrollo de la lesión, con lo que se desarrollaría menor volumen de lesión, y por otro lado *in vitro* observamos el mismo efecto en el grupo tratado con el Clazosentán.

En el trabajo de *Koyama et al*¹³³, se sugiere la hipótesis de que la activación de los receptores B provocaría una disminución en la expresión de las AQP, por lo que la acción de los antagonistas provocaría un aumento en la expresión de las AQP. De esta manera nuestros resultados están de acuerdo con esta hipótesis, ya que tras la administración de BQ-788, antagonista del receptor B, observamos un aumento en la expresión de la AQP4 y la AQP9, tanto *in vivo* como *in vitro*.

En el caso del tratamiento combinado, observamos que no hay diferencias en los niveles de AQP con respecto al control tanto *in vivo* como *in vitro*.

Sin embargo, el tratamiento con BQ-788 *in vitro* se asocia a una disminución de la muerte celular, al contrario de lo que sucede en la situación *in vivo*. Se sabe que la isquemia *in vivo* produce un aumento en la expresión de los receptores B¹⁹⁰. Ese aumento en la expresión también podría suceder en la isquemia *in vitro*. Sin embargo, al existir dos subpoblaciones de receptores B, de los cuales en el caso de los astrocitos no se conoce exactamente a qué subtipo pertenecen, las señales intracelulares puede que sean diferentes ocasionando el efecto final que vemos *in vitro*, es decir un aumento de los niveles de AQP con una menor muerte celular que el control.

Las diferencia que observamos en cuanto a neuroprotección de cada uno de los antagonistas entre el modelo *in vivo* y el modelo *in vitro* podría ser explicada teniendo en cuenta que en el modelo *in vivo* el

sistema de la ET-1 estaría regulando dos mecanismos que actúan conjuntamente sobre el desarrollo de la lesión: por un lado regulación de la perfusión microvascular tras la isquemia mediada por los receptores de la ET-1 presentes en la capa de musculatura lisa que rodea al vaso sanguíneo, como ha sido demostrado en la bibliografía previa¹¹⁶, y por otro lado, regulación de la producción de las AQP, de forma que los diferentes receptores dependiendo del tipo celular en el que se encuentren medien respuestas diferentes. En cambio en el modelo *in vitro* el único mecanismo que estaría regulando el sistema de la ET-1 sería el de las AQP.

7.1.6. Resumen.

En el modelo *in vitro*, observamos que el uso de los antagonistas de la ET-1 muestran un claro efecto reductor de la muerte celular, tanto el específico del receptor A como del receptor B, estando también implicadas en este proceso las AQP.

Existe una clara relación entre la ET-1 y las AQP en el desarrollo del edema cerebral. En modelos animales los antagonistas del receptor A de la ET-1 muestran un importante efecto neuroprotector, mediado en parte por la regulación de la perfusión microvascular y por otra parte una menor producción de AQP.

7.2. ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA ET-1 CON EL GRADO DE EDEMA EN PACIENTES CON ICTUS ISQUÉMICO

La secuenciación del genoma humano ha revelado que la secuencia genética es idéntica en más de un 99% en el género humano. Sin embargo, pese a este gran índice de similaridad existen todavía más de 12 millones de potenciales variaciones. A las diferencias en la estructura génica que ocurren muy infrecuentemente en la población se les denomina mutaciones, mientras que a aquellas diferencias que ocurre más habitualmente se les denomina polimorfismos. Existen múltiples variedades de polimorfismos, dentro de éstas se denomina SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) al cambio de un solo nucleótido en la cadena del ADN. Hasta la fecha han sido cuantificados 12 millones de SNPs. Algunos SNPs están en zonas del gen que transcriben proteínas, influyendo en la estructura de la proteína resultante, otros están en áreas donde no influyen directamente en la síntesis de la proteína, pero influyen en la capacidad de la célula para producir variaciones cuantitativas en la proteína a través de diversos mecanismos.

Muchas enfermedades comunes se agrupan en patrones que demuestran que el trasfondo genético de los individuos juega algún papel en la susceptibilidad¹⁹¹. En la mayoría de las enfermedades comunes de alta prevalencia (como la enfermedad coronaria, la hipertensión arterial, enfermedades cerebrovasculares, etc.) sabemos que múltiples factores genéticos y no genéticos interactúan para afectar el fenotipo. Estas enfermedades y rasgos reciben, desde el punto de vista genético, el nombre de “rasgos complejos” y para la mayoría de ellas la variación atribuible al componente genético subyacente sigue siendo desconocida. Las dos principales metodologías usadas para mapear las variantes genéticas que influyen en el riesgo de enfermedad son los estudios de desequilibrio de ligamiento y los estudios de

asociación. Estos últimos buscan relacionar un marcador genético particular con un rasgo complejo o enfermedad a través de una población. Cuando se plantea un estudio de asociación genética se deben tener en cuenta tres aspectos importantes: la enfermedad o rasgo a ser estudiado, el grupo de individuos en los cuales se va a medir la característica de interés y por último qué SNPs se van a estudiar a lo largo de toda la población

En nuestro caso las variables de estudio con las que se evaluó la asociación de los SNPs fueron los niveles séricos de ET-1, el pronóstico funcional a los 3 meses, el grado de edema, el volumen de infarto y el deterioro neurológico precoz, en los pacientes incluidos en el estudio.

En relación a los SNPs elegidos, varios estudios previos han demostrado su implicación en múltiples enfermedades. En el caso del SNP rs5370, ha sido demostrado su implicación en la enfermedad de pequeño vaso¹⁹². El SNP rs1800541 se encuentra implicado en el desarrollo del asma, en el desarrollo de la artritis y en el metabolismo lipídico junto con el SNP rs5370¹⁹³. El SNP rs2071942 tiene influencia en los niveles séricos de ET-1 en pacientes aquejados de fallo cardíaco crónico y en enfermedad de pequeño vaso¹⁹⁴. En un estudio publicado en el año 2009, se evaluó la influencia de determinados SNPs, entre los cuales podemos encontrar el rs5370 y el rs2071942, en la función endotelial en la migraña y en el ictus¹⁹⁵.

En relación con el tipo de estudio epidemiológico hemos utilizado una cohorte de pacientes, ya que lo que pretendimos evaluar era la influencia de la presencia de los SNPs en las variables de estudio en pacientes. Sin embargo, una de las principales desventajas que tiene este tipo de estudio con respecto a un estudio de casos y controles es la

incapacidad de comprobar la similaridad de las frecuencias genotípicas de un SNP de la población de estudio con respecto a una población de referencia de individuos sanos. En nuestro caso, para comprobar si las frecuencias genotípicas de cada SNP dentro de nuestra población eran normales, las comparamos con los datos correspondientes a una población europea registrados en la base de datos *Single Nucleotide Polymorphism (Ver Resultados)*

De los tres SNPs analizados, encontramos que el rs5370 y el rs1800541 se encuentran en situación de equilibrio de Hardy-Weinberg, por lo que las conclusiones que obtengamos de su estudio en nuestra población serán válidas para toda la población, no existiendo, por tanto, en nuestra población de estudio, desviaciones o sesgos del equilibrio de Hardy-Weinberg, como endogamia, deriva genética, migración, existencia de nuevas mutaciones o selección de un determinado genotipo.

En cambio para el SNP rs2071942 los datos presentes en la base de datos muestran, sorprendentemente, que la población europea es única y exclusivamente heterocigota para este SNP, lo cual se aleja bastante de nuestros valores.

Tanto el SNP rs5370 y el SNP rs1800541 muestran una clara asociación con los niveles de ET-1 sérico en el momento del ingreso del paciente. Como ya hemos dicho, los SNPs de un gen pueden influir de diferentes maneras en la producción de la proteína que codifica ese gen. En línea con esto el SNP rs5370 está localizado en el exón 5 del gen de la ET-1 y su modificación produce un cambio de lisina por arginina en la proteína resultante. Con respecto a este SNP existen diferentes estudios donde afirman que el alelo mutante (alelo T) de este SNP se asocia a mayores niveles de ET-1 plasmática, lo cual coincide con nuestros resultados ya

que hemos demostrado que los pacientes homocigotos mutantes presentan mayores niveles séricos de ET-1¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. Sin embargo es sorprendente pensar que un SNP localizado en una región alejada del promotor del gen induzca cambios cuantitativos en la proteína, siendo lo más plausible que se produzca un cambio en la funcionalidad o estabilidad de la proteína o que influya en la localización subcelular de la misma, pudiendo provocar cambios en su síntesis final.

En cambio, el SNP rs1800541 está localizado en la región promotora del gen de la ET-1, por lo que sería mucho más lógico que tuviese relación con los niveles de ET-1 circulantes en suero. Hallamos que la presencia conjunta de los SNPs rs5370 y rs1800541 conlleva una producción aumentada de ET-1 con respecto a aquellos pacientes que sólo presentan uno de los SNPs. La explicación es que estos dos SNPs forman un haplotipo. Sin embargo en el estudio de Panoulas observaron que existe una cierta tendencia de niveles elevados de ET-1 sérica en pacientes que presentan el haplotipo heterocigoto frente a aquéllos que no tienen ese haplotipo heterocigoto, pero que no llega a ser significativa¹⁹³.

El SNP rs2071942 está localizado en el intrón 4 del gen de la ET-1¹⁹⁹. No presenta asociación con los niveles de ET-1, pero este resultado habría que tomarlo con cautela, ya que al no coincidir las frecuencias genotípicas de nuestra población de estudio con las incluidas en la base de datos, no sabemos si se trata de un artefacto. De todas maneras, resulta bastante sorprendente que en la base de datos *Single Nucleotide Polymorphism* la población europea sea única y exclusivamente heterocigota cuando la población africana referente al mismo SNP,

presenta frecuencias genotípicas tremendamente diferentes de las europeas.

Por otro lado, al analizar la relación de los niveles de ET-1 con el edema cerebral, encontramos que nuestros resultados son coherentes con los resultados previos de nuestro grupo, ya que existe una correlación entre los niveles séricos altos de ET-1 en el momento del ingreso y los mayores grados de edema (evaluado tanto por la escala ASPECTS y la graduación del edema, considerándolo tanto de forma categórica como de forma continua)¹³¹. Igualmente encontramos una relación entre niveles elevados de ET-1 sérica elevados en el momento del ingreso y el volumen de lesión y mal pronóstico a los tres meses. En cambio, no encontramos relación entre los niveles de ET-1 y el deterioro neurológico precoz.

La fisiopatología vascular en la fase aguda del ictus implica cambios metabólicos y hemodinámicos, resultantes en la rotura de la barrera hematoencefálica^{200,201}. El tono cerebrovascular favorece la vasoconstricción parcial y desempeña un importante papel en la regulación del flujo sanguíneo cerebrovascular en respuesta a cambios en la presión de perfusión tanto como a alteraciones en los factores metabólicos y endoteliales. En esta fase aguda, la ET-1 regula la función endotelial mediando una vasoconstricción o vasodilatación dependiente del receptor, y participa en el aumento de la permeabilidad de la BHE^{202,203}. Se ha encontrado que en pacientes que sufren ictus, los niveles de ET-1 se encuentran elevados^{204,205}. En definitiva, todas estas observaciones están de acuerdo con nuestros resultados que muestran una asociación entre el desarrollo de edema cerebral grave y los niveles séricos de ET-1 elevados.

La causa del incremento de los niveles séricos de ET-1 en los pacientes con ictus todavía no está clara. Este fenómeno puede representar una sobreexpresión no específica de ET-1 por el endotelio vascular sistémico en respuesta al estrés asociado con el infarto cerebral agudo. Otra posible explicación podría ser que los niveles séricos elevados de ET-1 pueden reflejar la generación de ET-1 en las células endoteliales dañadas de los microvasos cerebrales isquémicos. Se sabe que la hipoxia estimula la síntesis de ET-1, y las concentraciones elevadas de trombina dentro de la región isquémica pueden contribuir igualmente a la inducción de la liberación de la ET-1.

Se ha demostrado que en aquellos pacientes que presentan un grado de edema elevado existe una correlación directa con el volumen de lesión, de forma que aquellos pacientes con mayores niveles de ET-1 presentarán mayor grado de edema y según lo anterior también mayor volumen de infarto²⁰⁶. Por otro lado, sabemos que el edema cerebral es el principal factor que contribuye a la mortalidad y morbilidad en el ictus, por lo que parece lógico pensar que aquellos pacientes que presentan mayor grado de edema y mayor volumen de lesión tendrán peor pronóstico a los 3 meses.

Sin embargo, no encontramos que la ET-1 estuviese asociada significativamente con el deterioro neurológico precoz. Una de las razones podría ser el bajo número de pacientes de nuestro estudio que presentan deterioro neurológico, que probablemente sean los mismos que desarrollaron edema maligno.

Entre las novedades que presenta este estudio con respecto al anterior publicado por nuestro grupo, podemos señalar que han sido incluidos un mayor número de pacientes, tratados con tPA y sin tPA, dando mayor

validez a la hipótesis planteada en el estudio inicial. Demostramos además la asociación directa de los SNPs rs5370 y rs1800541 con los niveles séricos de ET-1 en el momento del ingreso, y que los efectos de la presencia de los SNP rs5370 y rs18006541 en el edema cerebral y el volumen de infarto estarían mediados por un aumento de los niveles séricos de ET-1.

En el caso del pronóstico funcional a los 3 meses, la influencia del SNP rs5370 estaría mediada por un aumento en la producción de ET-1, sugiriendo que no existirían rutas intracelulares alternativas que puedan mediar el efecto de este SNP sobre el pronóstico funcional a los 3 meses. En el caso del SNP rs1800541 demostramos que se encuentra asociado con el mal pronóstico a los 3 meses. Cuando incluimos en el modelo estadístico la ET-1, la asociación mantuvo la fuerza, en contra de todos los análisis previos, donde al incluir en el modelo estadístico la ET-1, la asociación del SNP con la variable del estudio perdía potencia a favor de la asociación de la ET-1 con esa variable.

Por tanto podemos deducir que el SNP rs1800541 ejercería su efecto sobre el pronóstico funcional a los 3 meses de forma independiente a una mayor producción de ET-1.

7.2.1. Resumen .

Los SNPs rs5370 y rs1800541 presentan una asociación significativa con el grado de edema, el volumen de lesión y el mal pronóstico a los 3 meses, mediado por un incremento en los niveles de ET-1.

Además el SNP rs1800541 presenta una asociación significativa con el mal pronóstico a los 3 meses, independientemente de un incremento en los niveles de ET-1.

7.3. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.

Este estudio presenta una serie de limitaciones que es necesario reseñar. En primer lugar y con respecto al estudio *in vitro*, debemos señalar que no hemos observado protección frente a la muerte por apoptosis, cuantificada por el marcador de caspasa-3. Suponemos que esto puede ser debido al momento en el que se tomaron las muestras para poder evaluar la caspasa-3. Las muestras de lisados celulares fueron tomadas a las 24 horas tras la POG, en cambio si las muestras fuesen obtenidas después de las 24 horas tras la POG los resultados podrían haber sido diferentes.

En cuanto al estudio *in vivo*, la principal limitación viene derivada, como ya se ha comentado, de los criterios de exclusión de los animales operados, basados principalmente en mediciones de FSC, por lo que se hace inevitable el uso del sistema Láser-Doppler. A su vez, esto condiciona que no hayamos podido obtener imágenes por RM a tiempo cero (justo después del final de la operación y antes de la administración del tratamiento) de los volúmenes de lesión iniciales de los animales incluidos en el estudio.

En el caso del estudio clínico la principal limitación que podríamos señalar es la ausencia de un control poblacional, propio de los estudios de casos y controles, con el que poder comparar las frecuencias genotípicas de cada uno de los SNPs a estudio dentro de nuestra población. Para solventar esta limitación optamos por comparar las frecuencias genotípicas de nuestra población con una población de referencia, recogida en la base *Single Nucleotide Polimorphisms*,

evaluando si nuestra población se encontraba en equilibrio según la ley de Hardy-Weinberg. Al realizar esto, observamos que únicamente el SNP rs2071942 no se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg. Sin embargo, para testar el objetivo principal del estudio clínico no son estrictamente necesarios controles poblacionales, pues dicho objetivo fue analizar si los SNPs del gen de la ET-1 se asociaban a niveles séricos elevados de esta proteína.

Por otro lado, nuestros resultados muestran que los niveles séricos de ET-1 en el momento del ingreso son un importante biomarcador de desarrollo de edema cerebral en el ictus isquémico. El principal inconveniente que tiene el uso de la ET-1 como biomarcador diagnóstico, viene derivado de su método de análisis. Hasta el momento únicamente se emplean los kits de ELISA como test analíticos de “screening”. Esta técnica es lenta y cara y por tanto no es aplicable en la práctica clínica diaria, por lo que sería interesante desarrollar un sistema de detección mucho más rápido que el actual que pudiese mejorar el diagnóstico de los pacientes.

1. INTRODUCCIÓN
2. JUSTIFICACIÓN
3. HIPÓTESIS
4. OBJETIVOS
5. MATERIAL Y MÉTODOS
6. RESULTADOS
7. DISCUSIÓN
8. CONCLUSIONES
9. BIBLIOGRAFÍA

Estudio *in vitro*

1. La administración de los antagonistas de los receptores de ET-1 (clazosentan y BQ-788 así como su administración combinada) a un modelo *in vitro* de BHE reduce la muerte celular, medida por los niveles de LDH presentes en el sobrenadante del cultivo.
2. El tratamiento con BQ-788 induce un aumento en la producción de la AQP9.
3. El tratamiento con Clazosentan induce una disminución en la producción de AQP4.

Estudio *in vivo*

1. El tratamiento con Clazosentan y su combinación con el BQ-788 reduce el grado de edema medido a las 24, 72 horas y 7 días tras un episodio de isquemia cerebral transitoria.
2. El tratamiento combinado del Clazosentan con el BQ-788 reduce significativamente el volumen de lesión absoluto a las 24, 72 horas y 7 días, tras un episodio de isquemia cerebral transitoria.
3. El tratamiento con Clazosentan induce una mejor recuperación funcional a las 24, 72 horas y 7 días tras un episodio de isquemia cerebral transitoria.
4. El tratamiento con Clazosentan provoca una reducción de los niveles de ET-1 a las 72 horas y a los 7 días tras un episodio de isquemia cerebral transitoria.
5. El tratamiento con Clazosentan induce una reducción en la producción de la AQP4. El tratamiento con BQ-788 induce un aumento en la producción de la AQP9.

Estudio clínico

1. La presencia de los SNPs del gen de la ET-1 rs5370 y rs1800541 en pacientes con ictus isquémico agudo se asocia significativamente con niveles séricos elevados de ET-1.
2. Los niveles séricos elevados de ET-1 se asocian a mayor gravedad de edema, mayor volumen de infarto y mal pronóstico funcional a los 3 meses.
3. La presencia de los SNPs rs5370 y rs1800541 se asocia significativamente con edema cerebral grave y mayor volumen de infarto a través de una producción aumentada de ET-1.
4. La presencia del SNP rs1800541 se asocia con el mal pronóstico funcional a los 3 meses de forma independiente a los niveles séricos elevados de ET-1.

1. INTRODUCCIÓN
2. JUSTIFICACIÓN
3. HIPÓTESIS
4. OBJETIVOS
5. MATERIAL Y MÉTODOS
6. RESULTADOS
7. DISCUSIÓN
8. CONCLUSIONES
9. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO MONICA Project, Principal Investigators. The World Health Organisation MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. *J Clin Epidemiol.* 1988;41:105-114.
2. Eurostat. Causes of death - Standardised death rate 2006-2008. <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/eurostat/home/>
3. Juffe Stein A, Castro Beiras A, Calvo Gómez C, Cortés Laiño JA, González, Juanatey JR, Domínguez Sardina M, Puente Hernández J, López Rodríguez I, Gómara López S, Castillo Sánchez J, Fernández Villaverde JM, Varela-Portas Marió J, Seoane Díaz B, Hervada Vidal X. *Plan de saúde de Galicia 2005-2009. Enfermidades do aparello circulatorio.*
4. López-Pousa S, Vilalta J, Llinás J. *Incidencia de la enfermedad vascular en España: estudio en un área rural de Girona.* *Rev Neurol.* 1995;23:1074-1080.
5. Olalla MT, Medrano MJ, Sierra MJ, Almazán J. *Time trends, cohort effect and spatial distribution of cerebrovascular disease mortality in Spain.* *Eur J Epidemiol.* 1999;15:331-339.
6. Arboix A, Díaz J, Pérez-Sempere A, Álvarez-Sabín J, en nombre del Comité de Redacción ad hoc del Grupo de Estudio de las Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología. *Ictus: tipos etiológicos y criterios diagnósticos.* *Neurología.* 2002;17:3-12.
7. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3rd. *Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment.* *Stroke.* 1993;24:35-41.
8. Ustrell-Roig Xavier, Serena Leal Joaquín. *Ictus. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades cerebrovasculares.* *Rev Esp Cardiol.* 2007;60:753-769.
9. Gorelick PH. *Stroke Prevention.* *Arch Neurology.* 1995; 52:347-355.
10. Arboix A, García-Eroles L, Oliveres M, Massons JB, Targa C. *Clinical predictors of early embolia recurrence in presumed cardioembolic stroke.* *Cerebrovasc Dis.* 1998;8:345-353.
11. Wolf PA, D'Agostino RB, Belanger AJ, Kannel WB. *Possibility of stroke: A risk profile from the Framingham Study.* *Stroke.* 1991;22:312-318.
12. Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5:347-360.
13. Siesjö BK. Cerebral circulation and metabolism. *J Neurosurg.* 1984;60:883-908.

14. Pulsinelli W. Pathophysiology of acute ischemic stroke. *Lancet*. 1992;339:533-536.
15. Heiss WD, Graf R. The ischemic penumbra. *Curr Opin Neurol*. 1994;7:11-19.
16. Castillo J. Fisiopatología de la circulación cerebral. En: Castillo J, Noya M (eds). *Patología cerebrovascular isquémica*. Barcelona: Repro Disseny. 1993;59-66.
17. Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia: the ischemic penumbra. *Stroke*. 1981;12:723-725.
18. Powers WJ. The ischemic penumbra: usefulness of PET. En: Del Zoppo GJ, Mori E, Hacke W (eds). *Thrombolytic therapy in acute ischemic stroke II*. Berlin: Springer-Verlag. 1993:17-21.
19. Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol*. 1994;36:557-565.
20. Ginsberg MD, Pulsinelli WA. The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke. *Ann Neurol*. 1994;36:553-554.
21. Castillo J. Intervenciones diagnósticas y terapéuticas en las primeras seis horas de la isquemia cerebral. Tiempos de latencia. Intervención prehospitalaria. *Neurología*. 1995;10:1-7.
22. Mohr JP, Martí-Vilalta JL. Lacunes. In Barnett HJM, Mohr JP, Stein BM, Yatsu FM, eds. *Stroke. Pathophysiology, diagnosis and management*. New York: Churchill Livingstone. 1998:599-622.
23. Waxman SG, Davis PK, Black JA, Ranson BR. Anoxic injury of mammalian central white matter: Decreased susceptibility in myelin-deficient optic nerve. *Ann Neurol*. 1990;28:335-340.
24. Bruno V, Battaglia G, Copani A, D'Onofrio M, Di Iorio P, De Blasi A, Melchiorri D, Flor PJ, Nicoletti F. Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21:1013-1033.
25. Ginsberg MD. Injury mechanisms in the ischaemic penumbra. Approaches to neuroprotection in acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*. 1997;7:7-12.
26. Kermer P, Klöcker N, Bähr M. Neuronal death after brain injury. Models, mechanisms, and therapeutic strategies in vivo. *Cell Tissue Res*. 1999;298:383-395.
27. Ogawa S, Kitao Y, Hori O. Ischemia-induced neuronal cell death and stress response. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9:573-587.
28. Folbergrová J, Minamisawa H, Ekholm A, Siesjö BK. Phosphorylation of alpha and labile metabolites during anoxia: correlation to membrane fluxes of K^+ and Ca^{2+} . *J Neurochem*. 1990;55:1690-1696.

29. Castillo J, Leira R, Blanco M. Metalloproteinases and neurovascular injury. *Neurología*. 2004;19:312-320.
30. Rodrigo J, Fernández AP, Serrano J, Peinado MA, Martínez A. The role of free radicals in cerebral hipoxia and ischemia. *Free Radic Biol Med*. 2005;39:29-50.
31. Malmström BG. Cytochrome c oxidase. Structure and catalytic activity. *Biochim. Biophys. Acta*. 1979;549:281-303.
32. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol*. 2007;184:53-68.
33. Kimelberg HK. Current concepts of brain edema. Review of laboratory investigations. *J Neurosurg*. 1995;83:1051-1059.
34. Dávalos A, Toni D, Iweins F, Lesaffre E, Bastianello S, Castillo J, for the ECASS Group. Neurological deterioration in acute ischemic stroke. Potential predictors and associated factors in the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS) I. *Stroke*. 1999;30:2631-2636.
35. Hacke W, Schwab S, Horn M, Spranger M, De Georgia M, von Kummer R. Malignant middle cerebral artery infarction: clinical course and prognostic signs. *Arch Neurol*. 1996;53:309-315.
36. Sherman DG, Easton JD. Cerebral edema in a stroke: a common, often fatal complication. *Postgrad Med*. 1980;68:107-120.
37. Del Zoppo GJ, von Kummer R, Hamann GF. Ischemic damage of brain microvessels: Inherent risk for thrombolytic treatment in stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998;65:19.
38. Castillo J. Fisiopatología de la isquemia cerebral. *Rev Neurol*. 2000;30:459-464.
39. Brown D, Stow JL. Protein trafficking and polarity in kidney epithelium: from cell biology to physiology. *Physiol Rev*. 1996;76:245-297.
40. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigen family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96:511-516.
41. Sirotkin H, Morrow B, Saint-Jore B, Puech A, Das Gupta R, Patanajli SR, Skoultchi A, Weissman SM, Kucherlapati R. Identification, characterization and precise mapping of a human gene encoding a novel membrane-spanning protein from the 22q11 region deleted in velo-cardio-facial síndrome. *Genomics*. 1997;42:245-251.
42. Balda MS, Flores-Maldonado C, Cerejido M, Matter K. Multiple domains of occludin are involved in the regulation of paracellular permeability. *J Cell Biochem*. 2000;78:85-96.

43. Martin-Padura I, Lostaglio S, Scheemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa D, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* 1998;142:117-127.
44. Stevenson BR, Keon BH. The tight junction: morphology to molecules. *Annu Rev Cell Desv Biol.* 1998;14:89-109.
45. Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrana protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 1998;273:29745-29753.
46. Anderson JM. Cell signaling: MAGUK magic. *Curr Biol.* 1996;6:382-384.
47. Satoh H, Zhong Y, Isomura H, Saitoh M, Enomoto K, Sawada N, Mori M. Localisation of 7H6 tight junction-associated antigen along the cell border of vascular endothelial cells correlates with paracellular barrier functions against ions, large molecules and cancer cells. *Exp Cell Res.* 1996;222:269-274.
48. Cordenonsi M, D'Atri F, Hammar E, Parry DA, Kendrick-Jones J, Shore D, Citi S. Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3 and myosin. *J Cell Biol.* 1999;147:1569-1582.
49. Steinberg MS, McNutt PM. Cadherins and their connections: adhesion Junctions have broader functions. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11:554-560.
50. McCrea PD, Gumbiner BM. Purification of a 92 kDa cytoplasmatic protein tightly associated with the cell-cell adhesion molecule e-cadherin (uvomorulin). Characterization and extractability of the protein complex from the cell cytostructure. *J Biochem Chem.* 1991;266:4514-4520.
51. Perry VH, Anthony DC, Bolton SJ, Brown HC. The blood brain barrier and the inflammatory response. *Mol Med Today.* 1997;3:335-341.
52. Stein B, Khew-Goodall Y, Gamble J, Vadas MA. Transmigration of leukocytes. *Endothelium in Clinical Practice: Source and Target of Novel Therapeutics.* Marcel Dekker. 1997;149-202.
53. Burns AR, Bowden RA, McDonell SD, Walker DC, Odebunmi To, Donnachie EM, Simon SI, Entman ML, Smith CW. Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration. *J Cell Sci.* 2000;113:45-47.

54. Marks KS, Davis Tp. Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282:H1485-H1494.
55. Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke*. 1998;29:1020-1030.
56. Planas AM, Sole S, Justicia C, Farre ER. Estimation of gelatinase content in rat brain: effect of focal ischemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;278:803-807.
57. Benga Gh, Popescu O, Pop VI, Holmes RP. p-Chloromercuribenzenesulfonate binding by membrane proteins involved in water transport in human erythrocytes. *Biochemistry*. 1986;25:1535-1538.
58. Wayne R, Tazawa M. Nature of the water channels in the internodal cells of *Nitellopsis*. *J Membr Biol*. 1993;116:31-39.
59. Ishibashi K. Aquaporin superfamily with unusual npa boxes: S-aquaporins (superfamily, sip-like and subcelular-aquaporins). *Cell Mol Biol*. 2006;52:20-27.
60. Nozaki K, Ishii D, Ishibashi K. Intracellular aquaporins: clues for intracellular water transport?. *Pflügers Arch-Eur J Physiol*. 2008;456:701-707.
61. Itoh T, Rai T, Kuwahara M, Ko SB, Uchida S, Sasaki S, Ishibashi K. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;13:832-838.
62. Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*. 2000;407:599-605.
63. Ren G, Reddy VS, Cheng A, Melnyk P, Mitra AK. .Ren et al 2001. Visualization of a water-selective pore by electron crystallography in vitreous ice. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;13:98:1398-1403.
64. Savage DF, Egea PF, Robles-Colmenares Y, O'Connell JD 3rd, Stroud RM. Architecture and selectivity in aquaporins: 2.5 Å X-ray structure of aquaporin Z. *PLoS Biol*. 2003;1:E72.
65. Yukutake Y, Yasui M. Regulation of water permeability through aquaporin-4. *Neuroscience*. 2010;168:885-891.
66. Zelenina M. Regulation of brain aquaporins. *Neurochemistry International*. *Neurochem Int*. 2010;57:468-488.
67. Johansson PA, Dziegielewska KM, Ek CJ, Habgood MD, Møllgaard K, Potter A, Schuliga M, Saunders NR. Aquaporin-1 in the choroid plexus of developing mammalian brain. *Cell Tissue Res*. 2005;322:353-364.

68. Longatti PL, Basaldella L, Orvieto E, Fiorindi A, Carteri A. Choroid plexus and aquaporin-1: a novel explanation of cerebrospinal fluid production. *Pediatr Neurosurg*. 2004;40:277-283.
69. Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol*. 2007;22:778-784.
70. Warth A, Kroger S, Wolburg H. Redistribution of aquaporin-4 in human glioblastoma correlates with loss of agrin immunoreactivity from capillary basal laminae. *Acta Neuropathol*. 2004;107:311-318.
71. Verkman AS, Binder DK, Bloch O, Auguste K, Papadopoulos MC. Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758:1085-1093.
72. Zador Z, Stiver S, Wang V, Manley GT. Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;190:159-170.
73. Yang B, Zador Z, Verkman AS. Glial cell aquaporin-4 overexpression in transgenic mice accelerates cytotoxic brain swelling. *J Biol Chem*. 2008;283:15280-15286.
74. McCoy ES, Haas BR, Sontheimer H. Water permeability through aquaporin-4 is regulated by protein-kinase C and becomes rate-limiting for glioma invasion. *Neuroscience*. 2010;168:971-981.
75. Pasantes-Morales H, Cruz-Rangel S. Brain volume regulation: osmolytes and aquaporin perspectives. *Neuroscience*. 2010;168:871-884.
76. Warth A, Mittelbronn M, Wolburg H. Redistribution of the water channel protein aquaporin-4 and the K⁺ channel protein Kir 4.1 differs in low- and high- grade human brain tumors. *Acta Neuropathol*. 2005;109:418-426.
77. Badaut J, Petit JM, Brunet JF, Magistretti PJ, Charriaut-Marlangue C, Regli L. Distribution of aquaporin-9 in the adult rat brain: preferential expression in catecholaminergic neurons and in glial cells. *Neuroscience*. 2004;128:27-38.
78. Badaut J, Brunet JF, Petit JM, Guerin CF, Magistretti PJ, Regli L. Induction of brain aquaporin 9 (AQP9) in catecholaminergic neurons in diabetic rats. *Brain Res*. 2008;1188:17-24.
79. Loitto VM, Huang C, Sigal YJ, Jacobson K. Filopodia are induced by aquaporin-9 expression. *Exp Cell Res*. 2007;313:1295-1306.
80. Pexman JH, Barber PA, Hill MD, Sevick RJ, Demchuk AM, Hudon ME, Hu WY, Buchan AM. Use of the Alberta Stroke Programme Early CT Score (ASPECTS) for assessing CT scans in patients with acute stroke. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2001;22:1534-1542.

81. Barber PA, Demchuk AM, Zhang J, Buchan AM. Validity and reliability of a quantitative computed tomography score in predicting outcome of hyperacute stroke before thrombolytic therapy. ASPECTS Study Group. Alberta Stroke Programme Early CT Score. *Lancet*. 2000;355:1670-1674.
82. Weir NU, Pexman JH, Hill MD, Buchan AM; CASES investigators. How well does ASPECTS predict the outcome of acute stroke treated with IV tPA? *Neurology*. 2006;67:516-518.
83. Molina CA, Saver JL. Extending reperfusion therapy for acute ischemic stroke. *Stroke*. 2005;36:2311-2320.
84. Tsuji K, Aoki T, Tejima E, Arai K, Lee SR, Atochin DN, Huang PL, Wang X, Montaner J, Lo E. Tissue plasminogen activator promotes matrix metalloproteinase-9 upregulation after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2002;36:1954-1959.
85. Aoki T, Sumii T, Mori T, Wang X, Lo EH. Blood-brain barrier disruption and matrix metalloproteinase-9 expression during reperfusion injury. Mechanical versus embolic focal ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke*. 2002;33:2711-2717.
86. Longstaff C, Thelwell C. Understanding the enzymology of fibrinolysis and improving thrombolytic therapy. *FEBS Letters*. 2005;579:3303-3309.
87. Bardutzky J, Schwab S. Antiedema therapy in ischemic stroke. *Stroke*. 2007;38:3084-3094.
88. Diringer MN, Zazulia AR. Osmotic therapy: fact and fiction. *Neurocrit Care*. 2004;1:219-233.
89. Karibe H, Zarow GJ, Weinstein PR. Use of mild intraischemic hypothermia versus mannitol to reduce infarct size after temporary middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosurg*. 1995;83:93-98.
90. Paczynski RP, He YY, Diringer MN, Hsu CY. Multiple-dose mannitol reduces brain water content in a rat model of cortical infarction. *Stroke*. 1997;28:1437-1443.
91. Oktem IS, Menkü A, Akdemir H, Kontaş O, Kurtsoy A, Koç RK. Therapeutic effect of tirilazad mesylate (U-74006F), mannitol, and their combination on experimental ischemia. *Res Exp Med. (Berl)* 2000;199:231-242.

92. Manno EM, Adams RE, Derdeyn CP, Powers WJ, Diringner MN. The effects of mannitol on cerebral edema after large hemispheric cerebral infarct. *Neurology*. 1999;52:583-587.
93. Videen TO, Zazulia AR, Manno EM, Derdeyn CP, Adams RE, Diringner MN, Powers WJ. Mannitol bolus preferentially shrinks non-infarcted brain in patients with ischemic stroke. *Neurology*. 2001;57:2120-2122.
94. Kaufmann AM, Cardoso ER. Aggravation of vasogenic cerebral edema by multiple-dose mannitol. *J Neurosurg*. 1992;77:584-589.
95. Kempinski O. Hypertonic saline and stroke. *Crit Care Med*. 2005;33:259-260.
96. Rabinstein AA. Treatment of cerebral edema. *Neurologist*. 2006;12:59-73.
97. Vialet R, Albanèse J, Thomachot L, Antonini F, Bourgouin A, Alliez B, Martin C. Isovolume hypertonic solutes (sodium chloride or mannitol) in the treatment of refractory posttraumatic intracranial hypertension: 2 mL/kg 7.5% saline is more effective than 2 mL/kg 20% mannitol. *Crit Care Med*. 2003;31:1683-1687.
98. Meyer JS, Itoh Y, Okamoto S, Welch KM, Mathew NT, Ott EO, Sakaki S, Miyakawa Y, Chabi E, Ericsson AD. Circulatory and metabolic effects of glycerol infusion in patients with recent cerebral infarction. *Circulation*. 1975;5:701-712.
99. Steiner T, Ringleb P, Hacke W. Treatment options for large hemispheric stroke. *Neurology*. 2001;57:61-68.
100. Righetti E, Celani MG, Cantisani T, Sterzi R, Boysen G, Ricci S. Glycerol for acute stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004;2:CD000096.
101. Woodcock J, Ropper AH, Kennedy SK. High dose barbiturates in non-traumatic brain swelling: ICP reduction and effect on outcome. *Stroke*. 1982;13:785-787.
102. Rockoff MA, Marshall LF, Shapiro HM. High-dose barbiturate therapy in humans: a clinical review of 60 patients. *Ann Neurol*. 1979;6:194-199.
103. Nagao S, Kitaoka T, Fujita K, Kuyama H, Ohkawa M. Effect of tris-(hydroxymethyl)-aminomethane on experimental focal cerebral ischemia. *Exp Brain Res*. 1996;111:51-56.

104. Aiyagari V, Diringner MN. Management of large hemispheric strokes in the neurological intensive care unit. *Neurologist*. 2002;8:152-162.
105. Schwab S. Therapy of severe ischemic stroke: breaking the conventional thinking. *Cerebrovasc Dis*. 2005;20:169-178.
106. Ayata C, Ropper AH. Ischaemic brain oedema. *J Clin Neurosci*. 2002;9:113-124.
107. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Sudano I, Magagna A, Salvetti A. Role of endothelin in the control of peripheral vascular tone in human hypertension. *Heart Fail Rev*. 2001;6:277-285.
108. Andresen J, Shafi NI, Bryan RM Jr. Endothelial influences on cerebrovascular tone. *J Appl Physiol*. 2006;100:318-327.
109. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;31:411-415.
110. Takahashi M, Matsushita Y, Iijima Y, Tanzawa K. Purification and characterization of endothelin-converting enzyme from rat lung. *J Biol Chem*. 1993;268:21394-21398.
111. Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D, Yanagisawa M. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell*. 1994;78:473-485.
112. Emoto N, Yanagisawa M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem*. 1995;270:15262-15268.
113. Maemura K, Kurihara H, Morita T, Oh-hashii Y, Yazaki Y. Production of endothelin-1 in vascular endothelial cells is regulated by factors associated with vascular injury. *Gerontology*. 1992;38:29-35.
114. Nunez DJ, Brown MJ, Davenport AP, Neylon CB, Schofield JP, Wyse RK. Endothelin-1 mRNA is widely expressed in porcine and human tissues. *J Clin Invest*. 1990;85:1537-1541.
115. Wagner OF, Christ G, Wojta J, Vierhapper H, Parzer S, Nowotny PJ, Schneider B, Waldhäusl W, Binder BR. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem*. 1992;267:16066-16068.
116. Dawson DA, Sugano H, McCarron RM, Hallenbeck JM, Spatz M. Endothelin receptor antagonist preserves microvascular perfusion and reduces ischemic brain damage following permanent focal ischemia. *Neurochem Res*. 1999; 24:1499-1505.
117. Klaus Fassbender, Britta Hodapp, Siegbert Rossol, Thomas Bertsch, Joachim Schmeck, Sandra Schütt, Michael Fritzinger, Peter Horn,

- Peter Vajkoczy, Martina Wendel-Wellner, Andreas Ragoschke, Sandra Kuehl, Jürgen Brunner, Ludwig Schürer, Peter Schmiedeck, and Michael Hennerici. Endothelin-1 in Subarachnoid Hemorrhage : An Acute-Phase Reactant Produced by Cerebrospinal Fluid Leukocytes. *Stroke*. 2000;31:2971- 2975.
- 118.** Gasic S, Wagner OF, Vierhapper H, Nowotny P, Waldhäusl W. Regional hemodynamic effects and clearance of endothelin-1 in humans: renal and peripheral tissues may contribute to the overall disposal of the peptide. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;19:176-80.
- 119.** Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*. 1990;20:732-735.
- 120.** Chen YX, Wang XQ, Fu Y, Yao YJ, Kong MY, Nie RQ, Wang JF. Pivotal role of inflammation in vascular endothelial dysfunction of hyperlipidemic rabbit and effects by atorvastatin. *Int J Cardiol*. 2011;146:140-144.
- 121.** Koedel U, Lorenzl S, Gorriz C, Arendt RM, Pfister HW. Endothelin B receptor-mediated increase of cerebral blood flow in experimental pneumococcal meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998;18:67-74.
- 122.** Jesmin S, Sakuma I, Togashi H, Yamaguchi T, Ueno K, Yoshioka M, Hattori Y, Kitabatake A, Miyauchi T. Altered expression of endothelin and its receptors in the brain of SHR-SP at malignant hypertensive stage. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;44:11-15.
- 123.** Taner CB, Severson SR, Best PJ, Lerman A, Miller VM. Treatment with endothelin-receptor antagonists increases NOS activity in hypercholesterolemia. *J Appl Physiol*. 2001;90:816-820.
- 124.** Motte S, McEntee K, Naeije R. Endothelin receptor antagonists. *Pharmacology & Therapeutics*. 2006;110:386–414.
- 125.** Görlach C, Hortobágyi T, Hortobágyi S, Benyó Z, Wahl M. Inhibition of endothelin-1 by the competitive ET_A receptor antagonist Ro 61-1790 reduces lesion volume after cold injury in the rat. *Pflügers Arch - Eur J Physiol*. 2001;441:844–849.
- 126.** Gupta YK, Briyal S, Sharma U, Jagannathan NR, Gulati A. Effect of endothelin antagonist (TAK-044) on cerebral ischemic volume, oxidative stress markers and neurobehavioral parameters in the middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sci*. 2005;77:15-27.
- 127.** Matsuo Y, Mihara Si, Ninomiya M, Fujimoto M. Protective effect of endothelin type A receptor antagonist on brain edema and injury

- after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 2001;32:2143-2148.
128. Zhang Y, Belayev L, Zhao W, Irving EA, Busto R, Ginsberg MD. A selective endothelin ET_A receptor antagonist, SB 234551, improves cerebral perfusion following permanent focal cerebral ischemia in rats. *Brain Research*. 2005;1045:150-156.
 129. De Gottardi A, Shaw S, Sagesser H, Reichen J. Type A, but not type B, endothelin receptor antagonist significantly decrease portal pressure in portal hypertensive rats. *Journal of Hepatology*. 2000;33:733-737.
 130. Chuquet J, Benchenane K, Toutain J, MacKenzie ET, Roussel S, Touzani. Selective blockade of endothelin-B Receptors exacerbates ischemic brain damage in the rat. *Stroke*. 2002;33:3019-3025.
 131. Moldes O, Sobrino T, Millán M, Castellanos M, Pérez de la Ossa N, Leira R, Serena J, Vivancos J, Dávalos A, Castillo J. High serum levels of endothelin-1 predict severe cerebral edema in patients with acute ischemic stroke treated with t-PA. *Stroke*. 2008;39:2006-2010.
 132. Lo AC, Chen AY, Hung VK, Yaw LP, Fung MK, Ho MC, Tsang MC, Chung SS, Chung SK. Endothelin-1 overexpression leads to further water accumulation and brain edema after middle cerebral artery occlusion via aquaporin 4 expression in astrocytic end-feet. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005;25:998-1011.
 133. Koyama Y, Tanaka K. Decreases in rat brain aquaporin-4 expression following intracerebroventricular administration of an endothelin ET B receptor agonist. *Neurosci Lett*. 2010;469:343-347.
 134. McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*. 1980;85:890-902.
 135. Fedoroff S, Richardson A. Protocols for neural cell culture. Springer Protocols. 2001:117-127.
 136. Jeliaskova-Mecheva VV, Bobilya DJ. A porcine astrocyte/endothelial cell co-culture model of the blood-brain barrier. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2003;12:91-98.
 137. Terasaki T, Ohtsuki S, Hori S, Takanaga H, Nakashima E, Hosoya K. New approaches to in vitro models of blood-brain barrier drug transport. *Drug Discov Today*. 2003;8:944-954.
 138. Garberg P, Ball M, Borg N, Cecchelli R, Fenart L, Hurst RD, Lindmark T, Mabondzo A, Nilsson JE, Raub TJ, Stanimirovic D, Terasaki T, Oberg JO, Osterberg T. In vitro models for the blood-brain barrier. *Toxicol In Vitro*. 2005;19:299-334.

- 139.** Grant GA, Abbott NJ, Janigro D. Understanding the Physiology of the Blood-Brain Barrier: In Vitro Models. *News Physiol Sci.* 1998;13:287-293.
- 140.** Fletcher NF, Brayden DJ, Brankin B, Worrall S, Callanan JJ. Growth and characterisation of a cell culture model of the feline blood-brain barrier. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;109:233-244.
- 141.** Cohen-Kashi Malina K, Cooper I, Teichberg VI. Closing the gap between the in-vivo and in-vitro blood-brain barrier tightness. *Brain Res.* 2009;1284:12-21.
- 142.** Ham RG, McKeenhan WL. Development of improved media and culture conditions for clonal growth of normal diploid cells. *In Vitro.* 1978;14:11-22.
- 143.** Vandeburgh HH, Karlisch P, Farr L. Maintenance of highly contractile tissue-cultured avian skeletal myotubes in collagen gel. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1988;24:166-174.
- 144.** Colgan OC, Collins NT, Ferguson G, Murphy RP, Birney YA, Cahill PA, Cummins PM. Influence of basolateral condition on the regulation of brain microvascular endothelial tight junction properties and barrier function. *Brain Res.* 2008;1193:84-92.
- 145.** Hoheisel D, Nitz T, Franke H, Wegener J, Hakvoort A, Tilling T, Galla HJ. Hydrocortisone reinforces the blood-brain properties in a serum free cell culture system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;247:312-315.
- 146.** Nitz T, Eisenblätter T, Psathaki K, Galla HJ. Serum-derived factors weaken the barrier properties of cultured porcine brain capillary endothelial cells in vitro. *Brain Res.* 2003;981:30-40.
- 147.** Goldberg MP, Choi DW. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: Calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci.* 1993;13:3510-3524.
- 148.** Koh JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Methods.* 1987;20:83-90.
- 149.** Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
- 150.** Bkaily G, Choufani S, Avedanian L, Ahmarani L, Nader M, Jacques D, D'Orléans-Juste P, Al Khoury J. Nonpeptidic antagonists of ETA and ETB receptors reverse the ET-1-induced sustained increase of cytosolic and nuclear calcium in human aortic vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 2008;86:546-556.

151. Ren A, Yan X, Lu H, Shi J, Yin Y, Bai J, Yuan W, Lin L. Antagonism of endothelin-1 inhibits hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008;86:536-540.
152. Okada M, Nishikibe M. BQ-788, a selective endothelin ET(B) receptor antagonist. *Cardiovasc Drug Rev*. 2002;20:53-66.
153. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20:84-91.
154. Roux S, Breu V, Giller T, Neidhart W, Ramuz H, Coassolo P, Clozel JP, Clozel M. Ro 61-1790, a new hydrosoluble endothelin antagonist: general pharmacology and effects on experimental cerebral vasospasm. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;283:1110-1118.
155. Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, Bland ST. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology*. 2000;39:777-787.
156. Haacke EM, Brown RW, Thompson MR, Venkatesan R. Magnetic resonance imaging: physical principles and sequence design. New York:Wiley Liss;1999.
157. Neurology Ad hoc committee of the Cerebrovascular Diseases Study Group of the Spanish Society of Neurology. Guidelines for stroke diagnosis and treatment. Prous Science Barcelona. 2004.
158. Cote R, Battista RN, Wolfson C, Boucher J, Adam J, Hachinski V. The Canadian Neurological Scale: validation and reliability assessment. *Neurology*. 1989;39:638-643.
159. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C reactive protein and low-density lipoproteins cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Eng J Med*. 2002;347:1557-1565.
160. Santaguida S, Janigro D, Hossain M, Oby E, Rapp E, Cucullo L. Side by side comparison between dynamic versus static models of blood-brain barrier in vitro: a permeability study. *Brain Res*. 2006;1109:1-13.
161. Tran ND, Wong VL, Schreiber SS, Bready JV, Fisher M. Regulation of brain capillary endothelial thrombomodulin mRNA expression. *Stroke*. 1996;27:2304-2310.
162. Hamm S, Dehouck B, Kraus J, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Risau W, Cecchelli R, Engelhardt B, Dehouck MP. Astrocyte mediated modulation of blood-brain barrier permeability does not correlate with a loss of tight junction proteins from the cellular contacts. *Cell Tissue Res*. 2004;315:157-166.

163. Kido Y, Tamai I, Nakanishi T, Kagami T, Hirose I, Sai Y, Tsuji A. Evaluation of blood-brain barrier transporters by co-culture of brain capillary endothelial cells with astrocytes. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2002;17:34-41.
164. Stanness KA, Neumaier JF, Sexton TJ, Grant GA, Emmi A, Maris DO, Janigro D. A new model of the blood-brain barrier: co-culture of neuronal, endothelial and glial cells under dynamic conditions. *Neuroreport.* 1999;10:3725-3731.
165. Gaillard PJ, Voorwinden LH, Nielsen JL, Ivanov A, Atsumi R, Engman H, Ringbom C, de Boer AG, Breimer DD. Establishment and functional characterization of an in vitro model of the blood-brain barrier, comprising a co-culture of brain capillary endothelial cells and astrocytes. *Eur J Pharm Sci.* 2001;12:215-222.
166. Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel A, Tanaka K, Niwa M. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int.* 2009;54:253-263.
167. Siddharthan V, Kim YV, Liu S, Kim KS. Human astrocytes/astrocyte-conditioned medium and shear stress enhance the barrier properties of human brain microvascular endothelial cells. *Brain Res.* 2007;1147:39-50.
168. Deli MA, Ábrahám CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol.* 2005;25:59-127.
169. Demeuse P, Kerkhofs A, Struys-Ponsar C, Knoops B, Remacle C, van den Bosch de Aguilar P. Compartmentalized coculture of rat brain endothelial cells and astrocytes: a syngenic model to study the blood-brain barrier. *J Neurosci Methods.* 2002;121:21-31.
170. Nakagawa S, Deli MA, Nakao S, Honda M, Hayashi K, Nakaoke R, Kataoka Y, Niwa M. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol.* 2007;27:687-694.
171. Abbruscato TJ, Davis TP. Combination of hypoxia/aglycemia compromises in vitro blood-brain barrier integrity. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;289:668-675.
172. Vemula S, Roder KE, Yang T, Bhat GJ, Thekkumkara TJ, Abbruscato TJ. A functional role for sodium-dependent glucose transport across the blood-brain barrier during oxygen glucose deprivation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;328:487-495.

173. Zehendner CM, Luhmann HJ, Kuhlmann CR. Studying the neurovascular unit: an improved blood-brain barrier model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29:1879-1884.
174. An P, Xue YX. Effects of preconditioning on tight junction and cell adhesion of cerebral endothelial cells. *Brain Res.* 2009;1272:81-88.
175. Haqqani AS, Kelly J, Baumann E, Haseloff RF, Blasig IE, Stanimirovic DB. Protein markers of ischemic insult in brain endothelial cells identified using 2D gel electrophoresis and ICAT-based quantitative proteomics. *J Proteome Res.* 2007;6:226-239.
176. Bagnato A, Loizidou M, Pflug B, Curwen J, Growcott J. Role of the endothelin axis and its antagonists in the treatment of cancer. *Br J Pharmacol.* 2011. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01217.x.
177. Fisher M, Albers GW, Donnan GA, Furlan AJ, Grotta JC, Kidwell CS, Sacco RL, Wechsler LR; Stroke Therapy Academic Industry Roundtable IV. Enhancing the development and approval of acute stroke therapies: Stroke Therapy Academic Industry roundtable. *Stroke.* 2005;36:1808-1813.
178. Prieto-Arribas R, Moreno-Gutiérrez A, Simal-Hernández P, Pascual-Garvi JM, Matías-Guiu J, Roda JM, Barcia-Albacar JA. Experimental models of cerebral ischemia. *Rev Neurol.* 2008;47:414-426.
179. Durukan A, Tatlisumak T. Animal models of ischemic stroke. *Handb Clin Neurol.* 2009;92:43-66.
180. Briyal S, Pant AB, Gupta YK. Protective effect of endothelin antagonist (TAK-044) on neuronal cell viability in in vitro oxygen-glucose deprivation model of stroke. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2006;50:157-62.
181. Zhang RL, Zhang C, Zhang L, Roberts C, Lu M, Kapke A, Cui Y, Ninomiya M, Nagafuji T, Albala B, Zhang ZG, Chopp M. Synergistic effect of an endothelin type A receptor antagonist, S-0139, with rtPA on the neuroprotection after embolic stroke. *Stroke.* 2008;39:2830-2836.
182. Hauck EF, Hoffmann JF, Heimann A, Kempfski O. EndothelinA receptor antagonist BSF-208075 causes immune modulation and neuroprotection after stroke in gerbils. *Brain Res.* 2007;1157:138-145.
183. Tatlisumak T, Carano RA, Takano K, Opgenorth TJ, Sotak CH, Fisher M. A novel endothelin antagonist, A-127722, attenuates ischemic lesion size in rats with temporary middle cerebral artery occlusion: a diffusion and perfusion MRI study. *Stroke.* 1998;29:850-857.

184. Tanaka K, Koyama Y. Endothelins decrease the expression of aquaporins and plasma membrane water permeability in cultured rat astrocytes. *J Neurosci Res.* 2011;89:320-328.
185. Watts SW. Endothelin receptors: what's new and what do we need to know? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;298:254-260.
186. Paolillo M, Russo MA, Curti D, Lanni C, Schinelli S. Endothelin B receptor antagonists block proliferation and induce apoptosis in glioma cells. *Pharmacol Res.* 2010;61:306-315.
187. Fukuroda T, Ozaki S, Ihara M, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M. Synergistic inhibition by BQ-123 and BQ-788 of endothelin-1-induced contractions of the rabbit pulmonary artery. *Br J Pharmacol.* 1994;113:336-338.
188. Ribeiro Mde C, Hirt L, Bogousslavsky J, Regli L, Badaut J. Time course of aquaporin expression after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci Res.* 2006;83:1231-1240.
189. Yeung PK, Lo AC, Leung JW, Chung SS, Chung SK. Targeted overexpression of endothelin-1 in astrocytes leads to more severe cytotoxic brain edema and higher mortality. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29:1891-1902.
190. Stenman E, Malmsjö M, Uddman E, Gidö G, Wieloch T, Edvinsson L. Cerebral ischemia upregulates vascular endothelin ET(B) receptors in rat. *Stroke.* 2002;33:2311-2316.
191. Hirschhorn JN. Genetic Approach to Studying Common Disease and Complex Traits. *Pediatric Research.* 2005;57:74-77.
192. Gormley K, Bevan S, Hassan A, Markus HS. Polymorphisms in genes of the endothelin system and cerebral small vessel disease. *Stroke.* 2005;36:1656-1660.
193. Panoulas VF, Douglas KM, Smith JP, Taffé P, Stavropoulos-Kalinoglou A, Toms TE, Elisaf MS, Nightingale P, Kitas GD. Polymorphisms of the endothelin-1 gene associate with hypertension in patients with rheumatoid arthritis. *Endothelium.* 2008;15:203-212.
194. Vasků A, Spinarová L, Goldbergová M, Muzik J, Spinar J, Vítovec J, Toman J, Vácha J. The double heterozygote of two endothelin-1 gene polymorphisms (G8002A and -3A/-4A) is related to big endothelin levels in chronic heart failure. *Exp Mol Pathol.* 2002;73:230-233.
195. MacClellan LR, Howard TD, Cole JW, Stine OC, Giles WH, O'Connell JR, Wozniak MA, Stern BJ, Mitchell BD, Kittner SJ. Relation of candidate genes that encode for endothelial function to migraine

- and stroke: the Stroke Prevention in Young Women Study. *Stroke*. 2009;40:550-557.
- 196.** Barden AE, Herbison CE, Beilin LJ, Michael CA, Walters BN, Van Bockxmeer FM. Association between the endothelin-1 gene Lys198Asn polymorphism blood pressure and plasma endothelin-1 levels in normal and pre-eclamptic pregnancy. *J Hypertens*. 2001;19:1775-1782.
- 197.** Tired L, Poirier O, Hallet V, McDonagh TA, Morrison C, McMurray JJ, Dargie HJ, Arveiler D, Ruidavets JB, Luc G, Evans A, Cambien F. The Lys198Asn polymorphism in the endothelin-1 gene is associated with blood pressure in overweight people. *Hypertension*. 1999;33:1169-1174.
- 198.** Asai T, Ohkubo T, Katsuya T, Higaki J, Fu Y, Fukuda M, Hozawa A, Matsubara M, Kitaoka H, Tsuji I, Araki T, Satoh H, Hisamichi S, Imai Y, Ogihara T. Endothelin-1 gene variant associates with blood pressure in obese Japanese subjects. The Ohasama Study. *Hypertension*. 2001;38:1321-1324.
- 199.** Kim HJ, Choi CP, Uhm YK, Kim YI, Lee JW, Yoon SH, Chung JH, Lee MH. The association between endothelin-1 gene polymorphisms and susceptibility to vitiligo in a Korean population. *Exp Dermatol*. 2007;16:561-566.
- 200.** Gasche Y, Copin JC. Blood-brain barrier pathophysiology and ischaemic brain oedema. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2003;22:312-319.
- 201.** Heo JH, Han SW, Lee SK. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radic Biol Med*. 2005;39:51-70.
- 202.** Zhou Y, Dirksen WP, Zweier JL, Periasamy M. Endothelin-1-induced responses in isolated mouse vessels: the expression and function of receptor types. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:573-578.
- 203.** Schiffrin EL. Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. *Am J Hypertens*. 2001;14:83-89.
- 204.** Estrada V, Téllez MJ, Moya J, Fernández-Durango R, Egido J, Fernández Cruz AF. High plasma levels of endothelin-1 and atrial natriuretic peptide in patients with acute ischemic stroke. *Am J Hypertens*. 1994;7:1085-1089.
- 205.** Brondani R, Rieder CR, Valente D, Araújo LF, Clausell N. Levels of vascular cell adhesion molecule-1 and endothelin-1 in ischemic stroke: a longitudinal prospective study. *Clin Biochem*. 2007;40:282-284.
- 206.** Serena J, Blanco M, Castellanos M, Silva Y, Vivancos J, Moro MA, Leira R, Lizasoain I, Castillo J, Dávalos A. The prediction of malignant

cerebral infarction by molecular brain barrier disruption markers. *Stroke*. 2005;36:1291-1296.

*"Caminante, son tus huellas
el camino, y nada más;
caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.
Al andar se hace camino
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.
Caminante, no hay camino,
sino estelas en la mar."*

Antonio Machado. Proverbios y cantares, XXIX